

Univerzita Karlova v Praze

1. lékařská fakulta



Studijní program: Specializace ve zdravotnictví

Studijní obor: Zdravotnická technika a informatika

ID studijního oboru: 201969

Charakterizace aktivních vrstev s pH převodníky pro fluorescenční pH vláknové senzory

Magisterská závěrečná práce

Vedoucí práce: Ing. Marie Pospíšilová, CSc.

Student: Ing. Pavel Škrabal

Červen 2010



UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE
1. LÉKAŘSKÁ FAKULTA
DĚKANÁT
STUDIJNÍ ODDĚLENÍ
121 08 PRAHA 2, KATEŘINSKÁ 32
tel.224964241

NAVAZUJÍCÍ MAGISTERSKE STUDIUM

Obor zdravotnická technika a informatika

VĚC: TÉMA DIPLOMOVÉ PRÁCE

V Praze, 8.12.2009

Student: ... Pavel Škrabal.....
(jméno a příjmení)

Zvolené téma diplomové práce: Charakterizace aktivních vrstev s pH převodníky pro fluorescenční
pH vláknové senzory

Characterization of active layers with pH dye for fluorescent pH fiber
optic sensors

Anotace:

Práce je zaměřena na tematiku určování pH v rostlinných buňkách. K tomuto měření se využívá vhodný optický pH převodník a optický vláknový taper s rozměrem menším než buňka. Cílem práce bude charakterizovat spektrální vlastnosti (absorpce a fluorescence) vybraných pH převodníků zachycených v různých materiálech a měřených v různých uspořádáních.

Úkoly:

- 1) Provést rešerši metod měření pH pomocí fluorescenční spektroskopie
- 2) Určit absorpční a fluorescenční spektra vybraných pH převodníků ve vodném roztoku pro různé hodnoty pH na fluorometru FLUOROLOG JOBIN YVON
- 3) Z naměřených spekter určit optimální vlnové délky vhodné pro měření pH vyhodnocením intenzit fluorescence a poměrovou metodou
- 4) Provést měření fluorescenčních spekter pH převodníků zachycených v substrátu pro různé hodnoty pH a různé excitační vlnové délky
- 5) Určit kalibrační křivky pro pH převodníky v substrátu a porovnat je s měřeními ve vodném roztoku.

Literatura: 1. Manuál k fluorimetru FLUOROLOG HORIBA JOBIN YVON
2. D.Wencel, B.D. High performance optical ratiometric sol-gel-based pH sensor
3. MacCraith, C. McDonagh, Sensors and Actuators B 139 (2009) 208–213
4. J. Zýka a kol., Analytická příručka SNTL/ALFA 1988

Pracoviště: Ústav fotoniky a elektroniky AV ČR, v.v.i. pracoviště Suchdol, Chaberská 57, 182 51
Praha 8

Vedoucí diplomové práce: Ing. Marie Pospíšilová, CSc.

Podpis:

Oponent: Ing. Gabriela Kuncová, CSc.

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem diplomovou práci s názvem

“Charakterizace aktivních vrstev s pH převodníky pro fluorescenční pH vláknové senzory“

vypracoval samostatně a výhradně s použitím citovaných pramenů, které uvádím v seznamu přiloženém k práci.

Nemám závažný důvod proti užití tohoto školního díla ve smyslu §60 Zákona č.121/2000 Sb., o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon).

V Praze dne

.....

podpis

Poděkování

Na tomto místě bych chtěl poděkovat především vedoucí mé diplomové práce paní Ing. Marii Pospíšilové, CSc. za cenné rady, odborné vedení, ochotu a trpělivost při zpracování.

Také velice děkuji panu Ing. Janu Mrázkovi, za jeho zájem a vůli pomáhat při řešení problémů souvisejících s měřením, jeho věcné připomínky a podmětne návrhy, které mi během práce uděloval. Děkuji mu také za jeho každodenní trpělivost a zájem při řešení experimentů.

Chtěl bych také poděkovat Ústavu fotoniky a elektroniky, oddělení technologie optických vláken za umožněná měření a všem jeho zaměstnancům, kteří byli vždy ochotní a vstřícní pomoci.

Velký dík pak patří všem, kteří mě celou dobu podporovali v mém studiu a při práci na diplomové práci. Především bych za to chtěl poděkovat celé své rodině i přátelům.

Identifikační záznam:

Škrabal, Pavel. *Charakterizace aktivních vrstev s pH převodníky pro fluorescenční pH vláknové senzory [Characterization of active layers with pH dye for fluorescent pH fiber optic sensors]*. Praha, 2009. 70 s., 2 tabulky, 18 obr., 23 grafů. Magisterská závěrečná práce. Ústav fotoniky a elektroniky, oddělení technologie optických vláken, pracoviště Suchdol, Praha 8. Vedoucí závěrečné práce: Ing. Marie Pospíšilová, CSc.

Abstrakt

Diplomová práce se zabývá problematikou měření pH (5-7) v rostlinných buňkách (20-100 μm). Vhodnou metodou měření pH je v tomto případě lokální optická mikro-detekce pH využívající vláknově-optickou detekci ke snímání změn poměru intenzit, emise excitovaného opticko-chemického převodníku (pH převodník), na dvou vlnových délkách (poměrové měření). Z naměřených absorpčních spekter pH převodníků rozpuštěných v kalibračních pufrch (kapalné vzorky), byly vybrány tři excitační vlnové délky. Z naměřených emisních spekter kapalných vzorků byly určeny časově stálé závislosti (kalibrační křivky) poměrových koeficientů na pH okolí převodníků BCECF, HPTS a HPCE. Kalibrační křivky převodníků BCECF a HPTS splňovaly požadavky na citlivost pro požadovaný rozsah měření pH. Tyto převodníky byly imobilizovány do xero-gelových vrstev (TEOS, APEX, PTES) a metodou dip-coating byly nanášeny na podložní sklíčka (pevné vzorky). Hodnoty pH kontrolního média odečtené z kalibračních křivek pevných vzorků (BCECF+TEOS a HPTS+PTES) se od hodnoty pH naměřenou potenciometricky lišily o 0,73.

Převodník BCECF imobilizovaný v TEOS byl nanášen na V-taper a byla provedena první zkušební měření pH.

Abstract

Diploma thesis is deal with the problem of plant intracellular pH measurement in range of pH5-pH7. Convenient method of pH measurement is in this case local optical micro-detection using so call pH transducers immobilized into matrices. Ratio-metric method of measurement of emission of excited transducer on two wavelengths is used. Tree excitation

wavelengths were chosen from measured absorption spectra of pH transducers which were solved in calibration buffers (liquid samples). Time independence calibration curves (dependence of ratio-coefficient on pH) of liquid samples were established from their emission spectra for transducers BCECF, HPTS and HPCE. The requirements of sensitivity in pH range satisfied BCECF and HPTS transducers. These transducers were immobilized into xero-gel layers (TEOS, APEX and PTES) and by dip-coating method coated on the glass slide (solid samples). The difference of pH values of control medium, which were read from the calibration curves of solid samples (BCECF + TEOS and HPTS + PTES) and from pH measured potentiometrically, were 0.73.

The first test measurement of pH was made by the V-taper with deposited active layer (transducer BCECF immobilized in TEOS) on its tip.

EVIDENCE VÝPŮJČEK

Prohlášení:

Beru na vědomí, že odevzdáním této závěrečné práce poskytuji svolení ke zveřejnění a k půjčování této závěrečné práce za předpokladu, že každý, kdo tuto práci použije pro svou přednáškovou nebo publikační aktivitu, se zavazuje, že bude tento zdroj informací řádně citovat.

V Praze, 24. 05. 2010

Podpis autora závěrečné práce

Jako uživatel potvrzuji svým podpisem, že budu tuto práci řádně citovat v seznamu použité literatury.

Jméno	Ústav / pracoviště	Datum	Podpis

Obsah

1	ÚVOD	9
2	SPEKTROSKOPICKÉ METODY MĚŘENÍ PH.....	11
2.1	LUMINISCENCE	11
2.2	FLUOROFORY	15
2.2.1	<i>Nevlastní fluorofory</i>	<i>16</i>
2.3	SONDY PRO MĚŘENÍ PH (PH INDIKÁTORY).....	16
2.4	DEFINICE PH	19
2.5	VLÁKNOVÉ OPTICKÉ SENZORY PRO MĚŘENÍ PH.....	19
2.5.1	<i>Sol-gel technologie.....</i>	<i>22</i>
2.5.2	<i>Reflexní metody měření pH.....</i>	<i>23</i>
2.5.3	<i>Kuželové optické senzory (Tapered optical sensors)</i>	<i>27</i>
3	EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	29
3.1	MĚŘÍCÍ APARATURA.....	29
3.2	ABSORPČNÍ SPEKTRA VYBRANÝCH PH PŘEVODNÍKŮ	31
3.3	EXCITAČNÍ A EMISNÍ SPEKTRA.....	35
3.4	POMĚROVÁ TECHNIKA ANALÝZY SPEKTER	38
3.5	POROVNÁNÍ POMĚROVÝCH KALIBRAČNÍCH KŘIVEK PH PŘEVODNÍKŮ.....	40
3.5.1	<i>Stabilita převodníku BCECF</i>	<i>41</i>
3.6	MĚŘENÍ IMOBILIZOVANÝCH PH PŘEVODNÍKŮ	43
3.6.1	<i>Imobilizace převodníků do xero-gelových vrstev.....</i>	<i>43</i>
3.6.2	<i>Porovnání xero-gelových vrstev s imobilizovaným převodníkem BCECF.....</i>	<i>45</i>
3.6.3	<i>Porovnání kalibračních křivek převodníku BCECF rozpuštěném v pufrech a imobilizovaném v TEOS</i>	<i>47</i>
3.6.4	<i>Ověření stability převodníku BCECF ve vrstvě (TEOS).....</i>	<i>48</i>
3.6.5	<i>Porovnání xero-gelových vrstev s převodníkem HPTS.....</i>	<i>50</i>
3.6.6	<i>Ověření stability převodníku HPTS ve vrstvě (PTES)</i>	<i>53</i>
3.7	MĚŘENÍ S V-TAPERÝ.....	55
3.7.1	<i>Přenosové vlastnosti V-taperů</i>	<i>55</i>
3.7.2	<i>Měření spekter převodníku BCECF V-taperem</i>	<i>56</i>
3.7.3	<i>Opakované měření s V-taperem</i>	<i>59</i>
3.7.4	<i>Měření s imobilizovaného převodníku na V-taperu</i>	<i>60</i>
4	DISKUZE	63
5	ZÁVĚR.....	69
6	LITERATURA	70

1 Úvod

Tato práce je zaměřena na problematiku měření pH v rostlinných buňkách. Pro studium morfogeneze rostlinných buněk a orgánů je důležité poznat a popsat tok auxinů přes plasmatickou membránu buněk. Auxiny jsou slabé kyseliny, takže směr i intenzita jejich toku je závislá na pH uvnitř (v organelách) a vně buňky. Rostlinné buňky mají rozměry v rozmezí ~ 20-100 μm , a protože pH je třeba změřit lokálně v živé buňce, byla za vhodnou metodu měření pH vybrána lokální optická mikrodetekce pH v buněčných strukturách v podmínkách in vivo [1].

Komerčně dostupné systémy pro detekci pH obvykle pracují na optických nebo elektrických principech. Jejich společnou vlastností jsou však relativně velké rozměry detekčních prvků (v řádu desítek až stovek mikrometrů, např. *Diamond Electrodes* aj.). Detekční systémy pH schopné měřit pH v objektech menších jak 10 μm nejsou v současnosti dostupné. Pro měření pH v rostlinných buňkách byla tedy zvolena metoda využívající vláknově-optickou detekci, která nabízí detekci v oblastech o rozměrech na úrovni jednoho mikrometru, popř. i menší. Pro realizaci tohoto přístupu bylo na Ústavu fotoniky a elektorniky¹ (ÚFE), oddělení technologie optických vláken navrženo využití detekčních optických vláken, které mají ve své určité části tvar válcového kónusu (taperu) s konečným rozměrem na požadované úrovni ($\Phi = 2\text{-}8\ \mu\text{m}$). Na konci kónické části optického vlákna se nachází vlastní detekční místo senzoru, kde je zachycen opticko-chemický převodník “pH převodník“, reagující vlastními optickými změnami (změna intenzity optické absorpce, fluorescence, fluorescenční doby života) na změny pH v těsném okolí detekčního místa. Tyto optické změny jsou detekovány s využitím světla, které se šíří v detekčním vlákně. Princip uvedeného přístupu včetně modelových pokusů zejména v objemových vzorcích byl v několika málo literárních odkazech již popsán, požadovaná taperovaná vlákna však nejsou komerčně dostupná [1]. Stejně tak nejsou ani podrobně popsány výhody, možnosti a postupy zachycení pH převodníku na optickém vláknovém taperu. Nejsou známy rozdíly v chování převodníku (změna intenzity optické absorpce, fluorescence, fluorescenční doby života) ve vrstvě a roztoku.

Cílem práce byla a) identifikace vhodných absorpčních převodníků pro měření v požadovaném rozsahu pH (konkrétně pH 5-7), charakterizace spektrálních vlastností (absorpce a fluorescence) vybraných pH převodníků zachycených v různých materiálech a měřených v různých uspořádáních; b) změření excitačních, emisních a absorpčních spekter

¹ Ústav fotoniky a elektroniky, Akademie věd ČR, v.v.i. Internetové stránky dostupné z: <http://www.ufe.cz>

vybraných pH převodníků ve vodném roztoku pro různé hodnoty pH a pro různé excitační vlnové délky s pomocí fluorometru FLUOROLOG JOBIN YVON. Z naměřených spekter určit závislost poměrového koeficientu na pH pro několik excitačních vlnových délek; c) měření excitačních a emisních spekter pH převodníků zachycených v porézní vrstvě na mikroskopickém skle pro různé hodnoty pH a různé excitační vlnové délky; d) Určení závislosti poměrového koeficientu na pH pro pH převodníky v porézní vrstvě a porovnat ji s měřeními ve vodném roztoku; e) změření časové stálosti pH převodníku a porovnání způsobů jejich imobilizace ve vrstvě a pro vybraný pH převodník imobilizovaný do matrice na V-taperu provést zkušební měření.

Obsah práce je rozčleněn do tří základních celků: V první, teoretické části práce je nejdříve popsán princip měření pH pomocí fluorescenční spektroskopie. Dále jsou popsány vláknové optické senzory pro měření pH. Ve druhé, praktické části, je podrobně popsána měřicí aparatura, jsou zde popsány realizace měření absorpčních, emisních a excitačních spekter. Rovněž jsou zde popsána měření s imobilizovanými převodníky, měření stability převodníků a ověření přesnosti kalibračních křivek. Na konci kapitoly jsou popsána měření s V-tapery.

V závěru práce jsou a diskutovány a zhodnoceny provedené experimenty a dosažené výsledky.

2 Spektroskopické metody měření pH

Principem měření pH pomocí fluorescenční spektroskopie je záznam změn intenzity fluorescence vhodného opticko-chemického pH převodníku. Jako pH převodníky se používají fluorescenční sondy reagující změnou intenzity fluorescence na změny pH v těsném okolí detekčního místa.

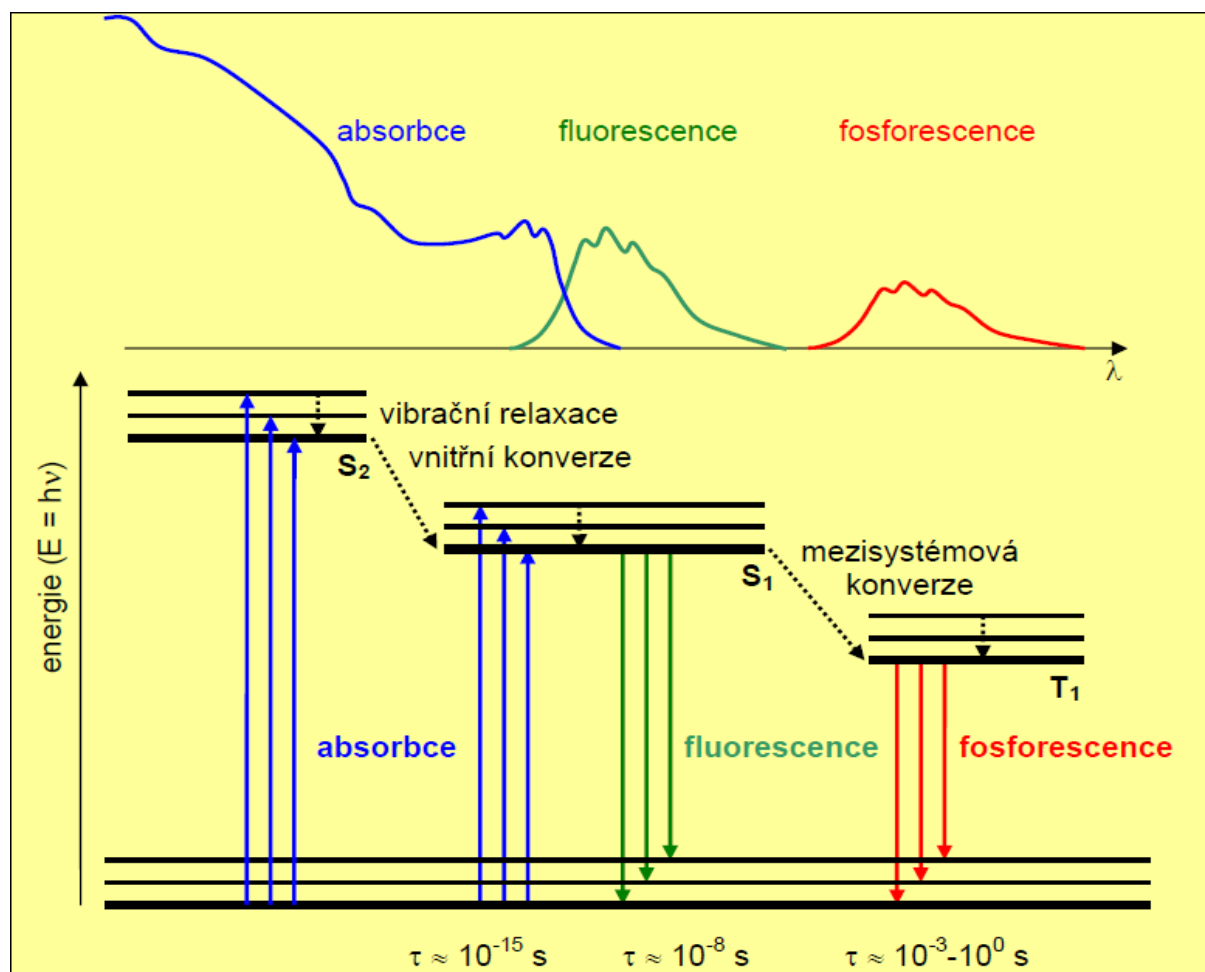
2.1 Luminiscence

Luminiscence je spontánní (samovolné) záření obvykle pevných nebo kapalných látek, které vzniká jako přebytek záření tělesa nad úroveň jeho tepelného záření v dané spektrální oblasti při dané teplotě, přitom toto záření má určitou dobu doznívání, tedy trvá i po skončení budícího účinku. Lze také říci, že luminiscence je děj, při němž záření o kratší vlnové délce (větší frekvenci) vyvolává v látce určitého složení vznik záření o delší vlnové délce (nižší frekvenci). Luminiscence vzniká excitací atomu působením jiného záření, elektronů apod. a následným návratem atomu do základního stavu, čímž dojde k vyzáření fotonu. Luminiscenci látky lze tedy pozorovat po jejím ozáření jiným zdrojem záření [7, 2].

Luminiscence se dělí na:

1. **fluorescenci** - Fluorescence je přechod mezi tzv. povolenými stavy atomu. Nastane-li emise záření z excitovaného elektronového stavu jedním či více spontánními energetickými přechody jedná se o fluorescenci. Praktické kritérium pro fluorescenci je, že ji pozorujeme během buzení a po jeho vypnutí prakticky ihned mizí (doba dohasínání je obvykle řádově 10^{-8} s).
2. **fosforescenci** - Fosforescence je přechod tzv. zakázaný. Uplatňuje-li se při emisi záření z excitovaného elektronového stavu metastabilní hladina, jedná se o fosforescenci. Praktické kritérium pro fosforescenci je, že má delší dobu dohasínání než fluorescence ($\gg 10^{-8}$ s) a obvykle ji nelze pozorovat v roztocích při pokojové teplotě.
3. **Zpožděná fluorescence** - Zpožděná fluorescence je zářivý přechod z téhož singletního stavu (S_1) jako při fluorescenci, ale s delší dobou dohasínání danou časem, po který je molekula v metastabilním tripletovém stavu. Doba dohasínání zpožděné fluorescence je přibližně rovna době dohasínání fosforescence.

Vlnová délka luminiscenční emise při fotoluminiscenci je větší nebo rovna vlnové délce excitačního světla ($\lambda_{em} \geq \lambda_{ex}$, Stokesův zákon). Charakteristické je také teplotní zhášení luminiscence, tj. snižování kvantového výtěžku s teplotou.



Obr. 2.1: Schéma zářivých a nezářivých přechodů mezi elektronově vibračními stavy složité molekuly (forma Jablonského diagramu, podle 2).

Na obr. 2.1 je zjednodušené schéma zářivých a nezářivých přechodů mezi elektronově vibračními stavy složité molekuly a tvar absorpčních a emisních spekter (λ - vlnová délka). Po absorpci světelného kvanta budícího záření (viz modré šipky) přechází elektrony ze singletního stavu S_0 do excitovaných singletních stavů S_1, S_2, \dots a tripletních stavů T_1, T_2, \dots . Molekula obvykle přejde z rovnovážné vibrační hladiny stavu S_0 do některé z vibračních hladin excitovaných stavů. K deexcitaci molekuly dochází buď zářivými přechody (luminiscence; viz zelené a červené šipky) nebo nezářivými přechody (vnitřní konverze, mezisystémová konverze, vibrační relaxace; viz černé tečkované šipky). Doba trvání τ jednotlivých procesů je pro absorpci řádově 10^{-15} s, pro fluorescenci 10^{-8} s, pro fosforescenci je mnohem delší než 10^{-8} s (obvykle se jedná o milisekundy až sekundy), pro vibrační relaxaci $10^{-12}-10^{-13}$ s, pro vnitřní konverzi $10^{-6}-10^{-12}$ s, pro mezisystémovou konverzi $10^{-4}-10^{-12}$ s.

Fluorescence je tedy spinově dovolený zářivý přechod, obvykle z rovnovážné vibrační hladiny stavu S_1 do některé z vibračních hladin základního stavu S_0 . Fosforescence je zářivý přechod z vyššího (T_1) do energeticky nižšího stavu o rozdílné multiplicitě (S_0). Zpožděná fluorescence je zářivý přechod z téhož singletního stavu (S_1) jako při fluorescenci, ale s delší dobou dohasínání danou časem, po který je molekula v metastabilním tripletovém stavu (molekula ve stavu T_1 absorbuje tepelnou energii, přejde do stavu S_1 a následuje fluorescenční přechod do S_0). Emisní spektrum zpožděné fluorescence je totožné s emisním spektrem okamžité fluorescence [2].

Většina známých, složitých organických molekul nefluoreskuje, intenzivní fluorescenci vykazují některé aromatické sloučeniny (polyaromatické uhlovodíky nebo heterocykly) nazývané fluorofory nebo fluorescenční barviva.

Charakteristika fluorescence:

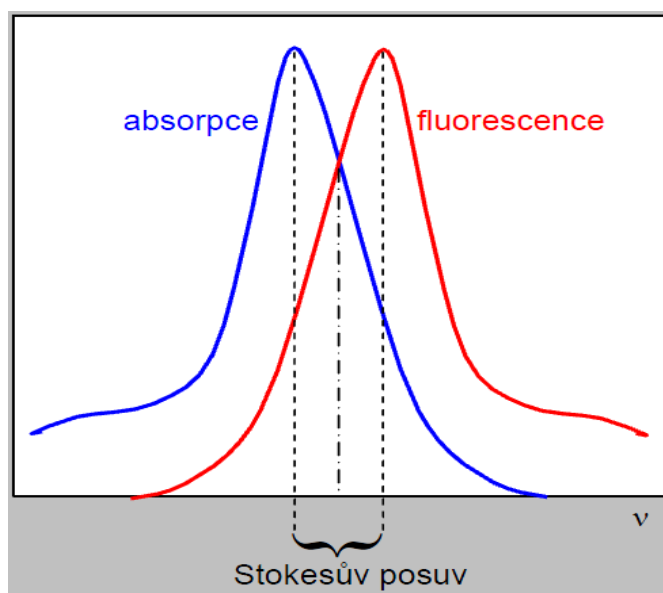
- **intenzita** – počet fotonů procházejících v daném směru jednotkovou plochou za jednotku času
- **spektrální složení** – spektrální hustota fotonového toku na jednotkový interval vlnových délek nebo frekvencí
- **polarizace** – směr kmitání elektrického vektoru elektromagnetické vlny
- **doba dohasínání** – je dána vnitřní dobou života excitovaného stavu, z něhož dochází k emisi, úzce souvisí s pochody vedoucími k nezářivé deaktivaci tohoto stavu
- **koherenční vlastnosti** – vzájemná souvislost vlnění, vztahy mezi fázemi světelných vln (koherence časová a prostorová)

Kvantový výtěžek a doba trvání excitovaného stavu složitých molekul v roztoku nezávisí žádným způsobem na vlnové délce budícího záření. Z toho vyplývá obecná vlastnost fluorescence: Emisní spektra jsou nezávislá na vlnové délce excitačního záření.

Emisní spektrum je závislost intenzity fluorescence na vlnové délce (nebo energii, vlnočtu, či frekvenci) při konstantní vlnové délce budícího (excitačního) záření. Excitační spektrum je závislost intenzity fluorescence na vlnové délce (nebo energii, vlnočtu, či frekvenci) při konstantní vlnové délce emitovaného záření.

Pro velké množství organických molekul platí zrcadlová symetrie mezi absorpčním a fluorescenčním pásem (obr 2.2). Tato symetrie je způsobena tím, že absorpce i emise z odpovídajících si vibračních hladin má stejnou relativní pravděpodobnost. Většina absorbujících i emitujících molekul se nachází v rovnovážném vibračním stavu, přičemž

vibrační struktura základního i excitovaného stavu mají stejnou strukturu. Po absorpci přechází elektron z rovnovážné vibrační hladiny stavu S_0 na vyšší vibrační hladinu stavu S_1 , poté dochází k rychlé vibrační relaxaci na rovnovážnou vibrační hladinu excitovaného stavu S_1 (v čase 10^{-12} - 10^{-13} s) a teprve poté následuje zářivý přechod na vyšší vibrační hladinu stavu S_0 a další vibrační relaxace na rovnovážnou vibrační hladinu stavu S_0 . Rozdíl v energiích mezi maximy absorpčního a emisního pásu se říká Stokesův posuv. Absorpce i emise záření probíhá tedy nejčastěji z nejnižší vibrační hladiny.[3] Výjimky z pravidla zrcadlové symetrie jsou obvykle důsledkem rozdílného geometrického uspořádání atomových jader v excitovaném stavu oproti uspořádání ve stavu základním [2].

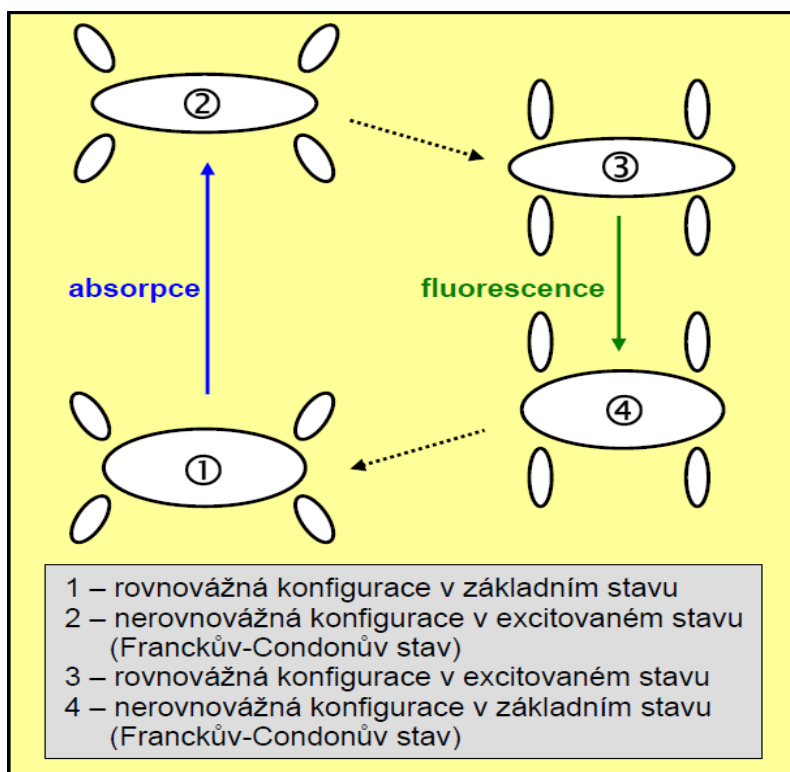


Obr. 2.2: Zrcadlová symetrie absorpčního a fluorescenčního pásu (podle 2).

Vliv prostředí na absorpční a emisní spektra

V roztocích dochází vlivem elektrostatických interakcí dipól-dipól, nebo dipól-indukovaný dipól mezi molekulami fluoroforu a rozpouštědla k solvataci fluoreskujících molekul (Obr. 2.3). Protože molekuly mají v základním a v excitovaném stavu obecně různé dipólové momenty i polarizovatelnosti, dochází při měření fluorescence v roztocích ke změnám v optických spektrech vlivem různé solvatace molekul. Doba potřebná pro molekulární relaxace je mnohem delší, než je rychlost elektronového přechodu, ale obvykle kratší, než doba života excitovaného stavu. K emisi proto dochází ze stavu, kdy již bylo dosaženo rovnovážné konfigurace. Protože část absorbované energie se spotřebuje na relaxaci molekul rozpouštědla kolem molekuly fluoroforu v excitovaném i základním stavu, je energie

emitovaného fluorescenčního záření menší, než by odpovídalo čistě elektronovému přechodu [2].



Obr. 2.3: Solvatace fluoroforu při absorpci a emisi v roztocích (podle 2).

Proces fluorescence je cyklický. Pokud není fluorofor nevratně zničen v excitovaném stavu (jev fotovybělování, *photobleaching*), potom může být tentýž fluorofor opakovaně excitován a může také opakovaně emitovat fluorescenční záření. Tato vlastnost je základem vysoké citlivosti fluorescenčních technik [2].

2.2 Fluorofory

Fluorofory jsou nejčastěji aromatické sloučeniny s intenzivní fluorescencí. Fluorofory můžeme rozdělit na vlastní (vnitřní, *intinsic*) a nevlastní (vnější, *extrinsic*). Vlastní fluorofory se vyskytují přirozeně v různých variantách biologických molekul. Nevlastní fluorofory se přirozeně nevyskytují a jsou přidávány ke vzorkům, které nemají vhodné fluorescenční vlastnosti. Vlastní fluorescenci vykazují např. proteiny, kofaktory (NADH, NADPH, riboflavin aj.), cytochromy, hemoglobin, atd. V proteinech jsou hlavními fluorofory aromatické aminokyseliny tryptofan, tyrozin a fenylalanin [3].

2.2.1 Nevlastní fluorofory

Vnější, neboli nevlastní fluorofory se používají mnohem více než vnitřní. Přidávají se ke studovanému vzorku, a pokud se na něj váží kovalentně, nazývají se fluorescenční značky, pokud se váží nekovalentně jedná se o fluorescenční sondy. Nevlastní fluorofory můžeme rozdělit na:

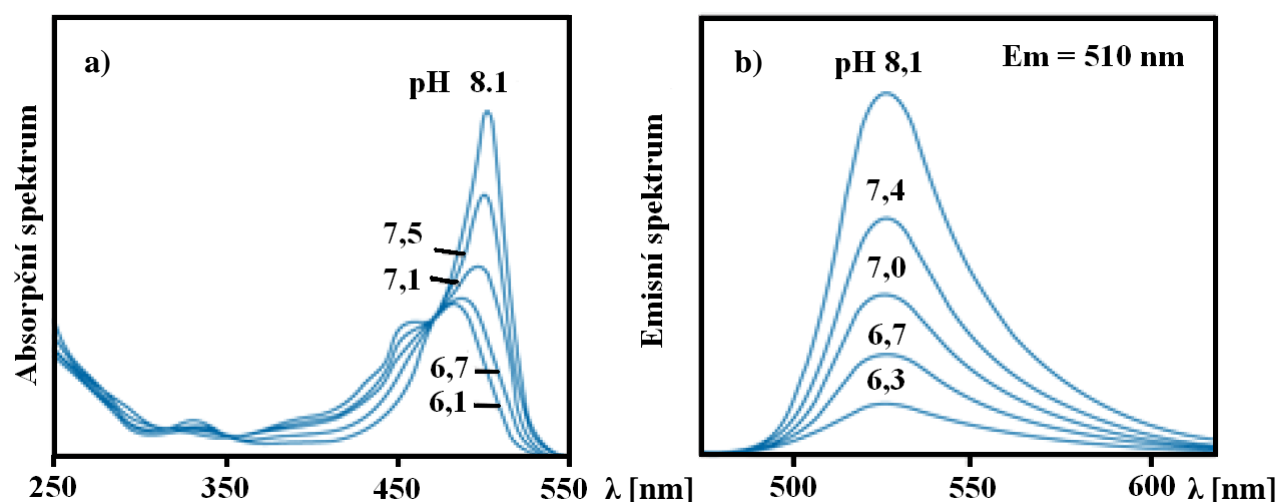
1. **Fluorescenční značky:** Nevlastní fluorofory, které se ke sledovaným biomolekulám (proteinům, peptidům, ligandům, oligonukleotidům a jiným) vážou kovalentní vazbou. Nejčastěji se používají k fluorescenčnímu značení proteinů, kdy se kovalentně vážou na jejich aminové, sulfhydrylové nebo histidinové boční řetězce, thiolové skupiny atd. Uplatňují se v různých aplikacích v imunologii, histochemii, afinitní chromatografii apod.
2. **Fluorescenční sondy:** Nevlastní fluorofory, které se ke sledované struktuře vážou nekovalentně a často přitom mění své fluorescenční vlastnosti. Volba fluorescenční sondy je klíčovou součástí experimentu ve fluorescenční spektroskopii, neboť právě její vlastnosti umožňují získat potřebné informace.
3. **Fluorescenční indikátory (chemické sondy):** Nevlastní fluorofory jejichž spektrální vlastnosti jsou citlivé na určitou látku. V současné době jsou existují fluorescenční indikátory pro řadu látek (vápníku, hořčíku, sodíku, kyslíku, fosfátu a pro pH). Obvykle tyto indikátory buď vykazují spektrální posuv v závislosti na přítomnosti dané látky, jejíž koncentrace se potom určuje z poměru intenzit při různých vlnových délkách excitace nebo emise, nebo se jedná o indikátory, které vykazují zvýšení intenzity fluorescence v přítomnosti dané látky, aniž by docházelo ke spektrálnímu posuvu [2].

2.3 Sondy pro měření pH (pH indikátory)

Jednou z prvních sond použitých pro nitrobuněčné měření pH byl fluorescein. Protože se fluorescein poměrně rychle z buněk uvolňuje a uniká do okolí buňky, používají se více jeho vysoce nabitě deriváty, jako **5(6)-karboxyfluorescein** nebo **2', 7'-bis-(2karboxyetyl)-5(6)-karboxyfluorescein (BCECF)**². Absolutní hodnota absorpance fluoresceinu s rostoucím pH roste. Poloha náběžné hrany absorpčních maxim fluoresceinu se s rostoucím pH posouvá k vyšším vlnovým délkám. Změny v absorpčním a emisním spektru fluoresceinu jsou

² Více informací na: <http://www.sigmaldrich.com>

způsobeny změnou rovnovážného stavu mezi monoanion a dianion formou fluoresceinu [3]. V emisním spektru většiny derivátů fluoresceinu dominuje emise z dianionu, jen s malým příspěvkem od monoanion fluoresceinu. V důsledku toho je vlnová délka emise a tvar emisního spektra většiny derivátů podobna emisnímu spektru dianionu. Poloha maxima emise je na pH relativně nezávislá, ale intenzita fluorescence se výrazně snižuje v kyselém prostředí [8]. Fluorescein samotný je středně vhodná sonda pro měření pH. Poměr intenzit fluorescence změřené při dvou excitačních vlnových délkách např. ($\lambda_1=450$ nm, $\lambda_2=495$ nm) se zvyšuje se zvyšujícím se pH. Derivát fluoresceinu BCECF (obr. 2.4) byl vyvinutý tak, aby měl podobné spektrální vlastnosti jako fluorescein, ale jeho pK_a byla posuta k vyšším hodnotám, $pK_a = 7$ [3].



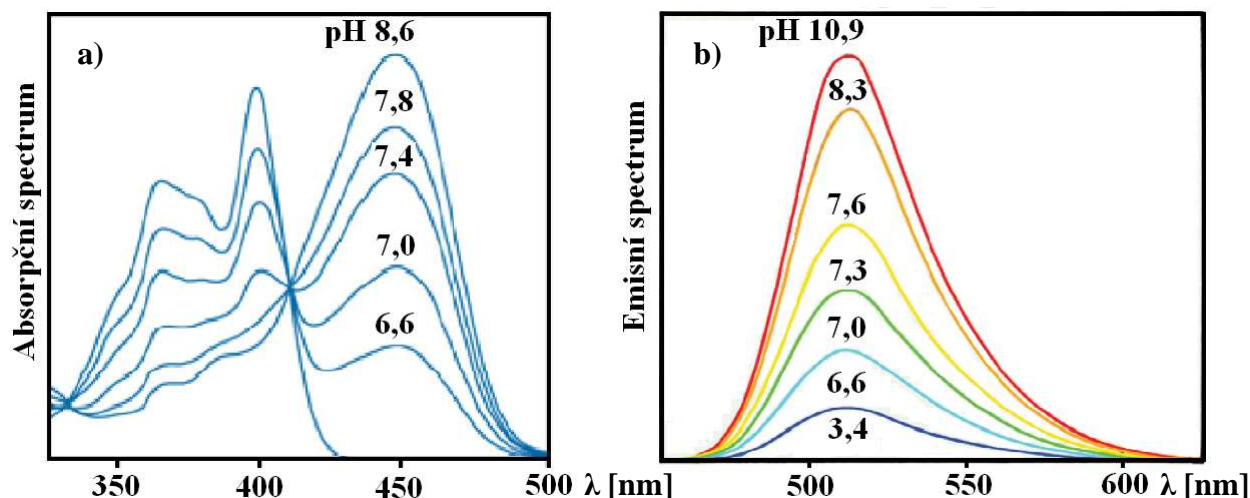
Obr. 2.4: Spektra BCECF v závislosti na pH a) Absorpční spektrum (závislost absorbance na vlnových délkách) b) emisní spektrum, závislost intenzity emise na vlnových délkách (podle 8).

Jistou nevýhodou fluoresceinu jako indikátoru pH je také jeho obtížné použití při poměrových měřeních³. Je to způsobeno nízkou absorpcí i emisí fluoresceinu při excitaci na 450 nm. Vhodnou sondou pro poměrová měření je 8-Hydroxypyrene-1,3,6-Trisulfonic Acid (HPTS)⁴. Sulfonové skupiny sondy způsobují dobrou rozpustnost HPTS ve vodě, hydroxylové skupiny zajišťují citlivost na pH. Excitační i emisní spektra HPTS jsou silně závislá na okolním pH. Absorpce HPTS na 450 nm s rostoucím pH roste, na 405 nm s rostoucím pH klesá. Tyto změny v absorpci se projevují i v emisních spektrech při excitaci na 450 a 405 nm. Maxima intenzity emise při excitaci 450 nm s rostoucím pH rostou, naproti tomu maxima intenzity emise při excitaci 405 nm s rostoucím pH klesají. Této protichůdní

³ Kalibrační křivka senzoru se při těchto měřeních sestavuje z poměru intenzity fluorescence (emise) při excitaci sondy na dvou vlnových délkách.

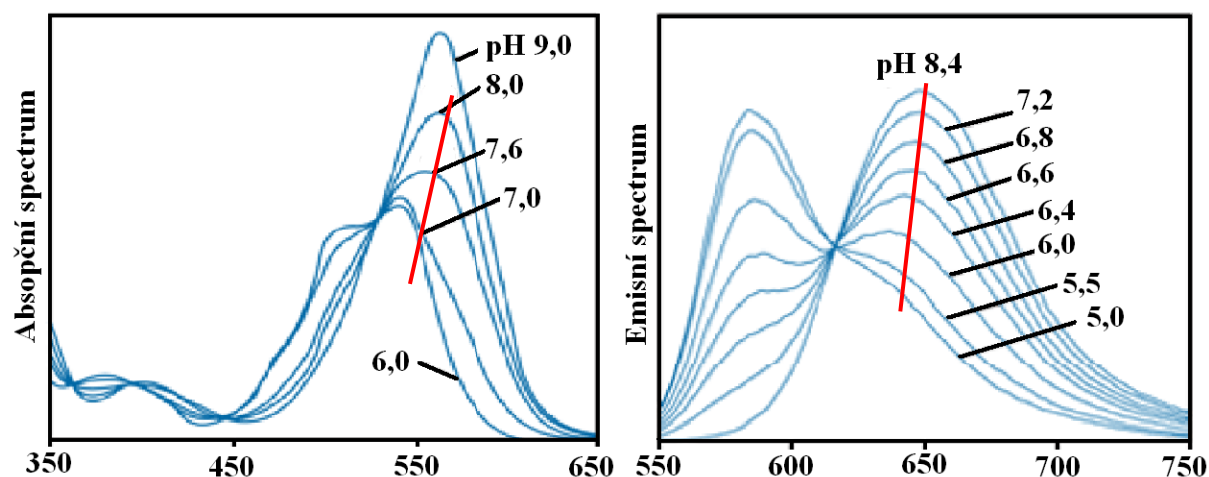
⁴ Více informací na: <http://www.sigmaaldrich.com>

tendence se úspěšně využívá při poměrovém měření. Výsledná kalibrační křivka následně umožňuje přesnější a jemnější odečítání měřeného pH. Disociační konstanta HPTS (pK_a) je blízko 7,5 a umožňuje měřit pH ve fyziologických vzorcích [3].



Obr. 2.5: Spektra HPTS v závislosti na pH a) Absorpční spektrum (závislost absorbance na vlnových délkách) b) emisní spektrum, závislost intenzity emise na vlnových délkách (podle 8, 3).

Seminaphthofluorescein (SNAFL) a Seminaphthorhodafluors (SNARF) patří do skupiny vylepšených pH indikátorů. Tyto Fluoresceiny je možné excitovat zářením o vlnových délkách patřící do viditelné oblasti spektra. Indikátory z této skupiny vykazují duální excitační i emisní vlastnosti. V závislosti na pH mění nejen velikost intenzity, ale i polohu maxima emise či excitace viz obr. 2.6.



Obr. 2.6: a) absorpční spektrum SNARF-1 (závislost absorbance na vlnových délkách) b) emisní spektrum SNARF-4F (závislost intenzity emise na vlnových délkách); spektra vykazují duální vlastnosti, v závislosti na pH se mění intenzita emise i poloha emisního maxima (posun k vyšším vlnovým délkám vyznačen červeně, podle 8).

Disociační konstanta sondy se nalézají mezi 7,6 až 7,9 a je tedy o něco vyšší než pK_a měřená intracelulárně. Indikátor SNARF je možné excitovat na 488 a 514 nm argonovým iontovým laserem a sondu je tedy možné používat pro přesná poměrová měření pH. Vysoká disociační konstanta SNARF může způsobovat potíže při měření intracelulárního pH, pro kvantitativní měření pH uvnitř cytosolu s typickým rozsahem hodnot pH 6,8-7,4 byla proto vyvinuta sonda SNARF-4F s $pK_a = 7,2$ [3, 8].

2.4 Definice pH

Kyselost neboli pH (*potential of hydrogen*) bylo prvně definováno dánským chemikem panem Sørensenem v roce 1909 jako záporný dekadický logaritmus koncentrace vodíkových iontů [4].

$$pH = -\log_{10} C_{H^+} \quad (2.1)$$

kde C_{H^+} představuje koncentraci H^+ iontů v roztoku

Později bylo zjištěno, že Sørensenem zavedená definice je mírně nepřesná, pokud je koncentrace iontů vysoká. Interakce iont-iont a další jevy snižují počet vodíkových iontů, které budou v reakci k dispozici. Proto byla Sørensenova definice pH časem nahrazena více vyhovující definicí pH zohledňující relativní aktivitu vodíkových iontů v roztoku. Tato moderní definice pH definuje pH jako počet aktivních H_3O^+ (*Hydronium, oxonium*) iontů v roztoku, přesněji jako záporný dekadický logaritmus koncentrace aktivních H_3O^+ iontů [5].

$$pH = -\log_{10} H_3O^+ \quad (2.2)$$

Kde H_3O^+ představuje koncentraci H_3O^+ iontů v roztoku

Výsledkem této definice pH je logaritmická stupnice s rozsahem hodnot od 0 do 14; přitom neutrální voda má $pH = 7$. U kyselin je pH menší než sedm – čím menší číslo, tím „silnější“ kyselina; naopak zásady mají $pH > 7$, čím větší číslo, tím „silnější“ zásada.

2.5 Vlákňové Optické senzory pro měření pH

Vlákňové optické senzory (OVS) pro měření pH můžeme nejjednodušeji rozdělit podle místa detekce na invazivní a neinvazivní. Invazivní senzory jsou přímo zaváděny do tkáňových struktur nebo jednotlivých buněk. Výhodou těchto senzorů je přesná, lokální detekce pH v daném místě, jejich nevýhodou je možnost narušení, nebo poškození cílových struktur či buněk. Neinvazivní senzory se naopak umísťují pouze do blízkosti povrchu

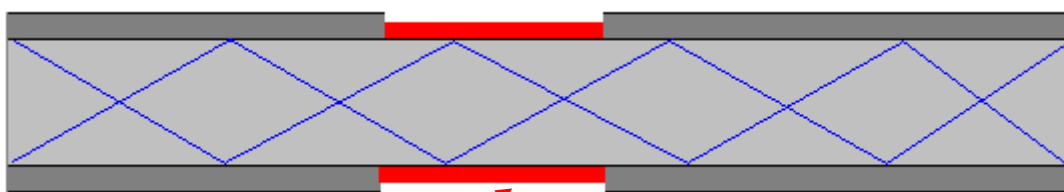
měřeného objektu nebo buňky, žádným způsobem tedy nenarušují měřené objekty. Jejich hlavní nevýhodou je obtížné měření pH v prostoru (měřený signál je sumací signálů z více míst) [10].

Senzory na bázi optických vláken (OVS) pro měření pH mají mnoho výhod oproti ostatním konkurenčním čidlům, jako jsou např. elektronické senzory s potenciometrickou a amperometrickou elektrodou. Je to zejména schopnost odolávat agresivnímu prostředí reduktáz uvnitř buňky a možnost jednoduché sterilizace, která optické sondy předurčuje pro využití v klinické chemii, buněčné biologii a medicíně. Výhodou je také, že detekovaný signál je optický a nemůže být tedy rušen elektrickými poli generovanými elektrochemickými reakcemi uvnitř organismu. Optická vlákna a integrovaná optika senzorů pro měření pH byla vyvinuta pro dálkové monitorování znečištění životního prostředí, pro biologické aplikace, zahrnující snímání klinických a biologicky důležitých parametrů jako např. krevních plynů, elektrolytů a enzymů. Tyto vlnovodné optické senzory jsou založeny na nejrůznějších snímacích systémech (senzory vnitřního i vnějšího prostředí, jedno vláknové i dvou vláknové konfigurace) využívajících různých spektroskopických technik, včetně absorpce, luminiscence, IR a Ramanovy spektrometrie. Vzhledem k tomu, že jen omezený počet analitu má užitečnou vlastní absorpci, nebo jiné spektroskopické vlastnosti, které mohou být přímo měřeny, byly vyvinuty vláknové optické technologie využívající takzvaný indikátor zprostředkovaného snímání. U těchto typů senzorů zprostředkovává analytickou informaci chemický indikátor, (např. indikátor pH, CO_2 , Na^+ , aj. indikátory) který je obvykle ve formě aktivní vrstvy imobilizován na povrchu optického vlákna [9].

Zajímavým způsobem omezení některých nežádoucích vlastností optických pH indikátorů je jejich imobilizace na vlákne v porézním substrátu (matrici). Póry substrátu musí být dostatečně velké, aby jimi mohli volně procházet H_3O^+ a OH^- ionty a zároveň dostatečně malé na to, aby jimi nemohly molekuly indikátoru unikat do okolního roztoku. Tímto způsobem je zajištěn kontakt indikátoru s okolním roztokem, indikátor může měnit svůj stav v závislosti na okolním pH, ale zároveň nemůže být v okolním roztoku rozpuštěn. Porézní matrice mohou být vyrobeny různými technikami, existuje tedy více druhů matric, např. polymerové plastové matrice (*polymer-based matrices*), nebo sol-gelové skleněné matrice (*sol-gel glass matrices*). K důležitým vlastnostem matric patří velikosti pórů, jejich chemická a fyzikální odolnost.

Jedním způsobem jak uspořádat měření s vláknovými senzory je zajistit přímý kontakt optického vlákna a porézní látky s imobilizovaným indikátorem (obr. 2.7). Porézní látka by měla mít nižší index lomu než vlákno, aby se světlo šířící vláknem na rozhraní jádra a vrstvy

indikátoru totálně vnitřně odráželo. S každým odrazem v zóně imobilizovaného indikátoru se mírně zeslabí evanescentní pole a změna intenzity je měřena na konci vlákna. Tyto senzory se často nazývají *Multiple Internal Reflections sensors (MRI)* nebo také *Evanescent field sensors* [5]. Film s pH indikátorem je možné také nanést přímo na čelo optického vlákna, tohoto způsobu využívají *Tapered optical sensors*. Film na konci vlákna je v přímém kontaktu s okolním pH, speciálně konstruovaným optickým vláknem je na film přiváděno excitační záření i odváděn fluorescenční signál ke zpracování. Nevýhodou těchto senzorů je poměrně složité spojení měřicí vrstvy s optickým vláknem a vysoká nestabilita vrstvy při styku s vnějším prostředím. Výhodou je možnost poměrně přesné detekce pH v malém prostoru.

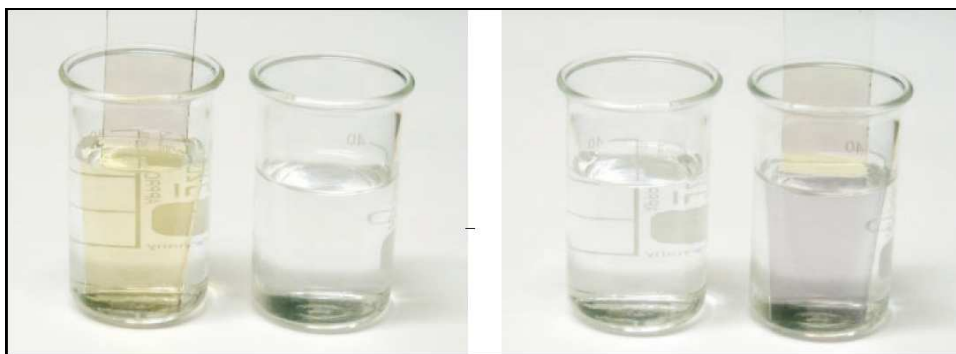


Vlákno kontaktované pH indikátorem v matrici

Obr. 2.7: Princip *Multiple Internal Reflections sensors (MRI)*, podle 5).

Dalším způsobem jak uspořádat měření je imobilizovat molekuly pH převodníku v tenké vrstvě (filmu) na skleněném substrátu. Takto potažený substrát se chová podobně jako lakmusový papírek (v závislosti na pH mění svoji barvu viz. obr. 2.8) Tento přístup přináší výhody spojené s vyšší stabilitou nanesené vrstvy, pH převodník je v ní pevněji zachycen a při kontaktu s vnějším prostředím nedochází k jeho úniku (vymývání) do okolí. Současně jsou však zachovány výhody optického měření, světlo je k substrátu přiváděno optickým vláknem a i signál z pH převodníku může být zachycován a veden ke zpracování pomocí optického vlákna umístěného v těsné blízkosti vrstvy. Tuto geometrii uspořádání využívají reflexní metody měření pH (*Reflective thin film indicator measurement*). Nevýhodou této metody je nemožnost měřit pH lokálně v malém prostoru, např. uvnitř jednotlivých buněk [5].

Optické vláknové sondy pro měření pH můžeme tedy podle místa imobilizace převodníku rozdělit na sondy, které mají pH převodník zachycený přímo na svém povrchu (*Evanescent field sensors, Tapered optical sensors*) a na sondy, které mají převodník zachycený na skleněném substrátu (*Reflective thin film indicator measurement*). Sondu pro měření pH je možno také umístit přímo do měřeného prostředí (roztoku, buňky) a pomocí optických vláken přivádět excitační a odvádět emisní záření. Tohoto uspořádání využívá mikroskopie v blízkém poli (NFSOM).



Obr. 2.8: Tenký pH citlivý film na skleněném substrátu vykazující vratné barevné změny v závislosti na pH (kyselý roztok vlevo zásaditý vpravo, podle 5).

2.5.1 Sol-gel technologie

Metoda sol-gel je typicky chemickou metodou přípravy speciálních nekovových materiálů (např. keramiky, skla), má širokou použitelnost v materiálovém inženýrství zvláště pro přípravu vrstev modifikujících fyzikální a chemické vlastnosti různých substrátů. Jedná se o skupinu postupů přípravy oxidických a příbuzných materiálů, jejichž společnými znaky jsou homogenizace výchozích složek ve formě roztoku, jejich převod na sol a následně na gel při zachování jejich homogenity [6]. V podstatě jde o transformaci kapalného systému (koloidní *sol*) na pevnou fázi (*gel*) [7]. Vrstvy připravené touto technikou se od sebe v zásadě vzájemně liší tloušťkou, porositou a kompaktností.

Prekurzory pro syntézu těchto materiálů jsou většinou atomy kovů nebo polokovů, na kterých jsou navázány různé reaktivní ligandy. Nejčastějšími látkami jsou alkokidy kovů, jelikož velmi dobře reagují s vodou. Nejpoužívanějšími alkokidy jsou alkokysilany a alkoxytitanáty, například tetraethoxysilan (TEOS) nebo tetra-*n*-buthylorthotitanat. Dalšími používanými prekurzory mohou být například alkokidy hliníku a boru. Pro nanášení solu na substrát se nejčastěji používá techniky vytahování (*dip-coating*) nebo odstředování (*spin-coating*). Technika *dip-coating* je proces, ve kterém je substrát nejprve ponořen do solu a poté z něho vytahován konstantní rychlostí za dané teploty. Následným tepelným zpracováním dochází k přeměně gelu na xerogel a dále na amorfní nebo krystalickou vrstvu. Při technice *spin-coating* rotuje substrát kolem vlastní osy, která je kolmá na nanášenou plochu. Na střed rotujícího substrátu je nanášen sol, jeho přebytečné množství odtéká z okraje substrátu ve formě kapek. Výhodou této techniky je rovnoměrná tloušťka vrstvy, nevýhodou je možnost použití na relativně malé plochy. Tloušťka výsledné vrstvy se může pohybovat od 15 do 300 nm. Charakteristickou vlastností vrstev vytvořených metodou sol-gel je jejich porosita. Vzniklé póry můžeme rozdělit na uzavřené a otevřené. Uzavřené póry nemají spojení s povrchem a je v nich uzavřen plyn. Otevřené póry jsou s povrchem naopak spojené,

přispívají k celkové velikosti povrchu a mohou procházet celou vrstvou (těmito póry pronikají H_3O^+ , OH^- ionty filmem k pH převodníku). [6].

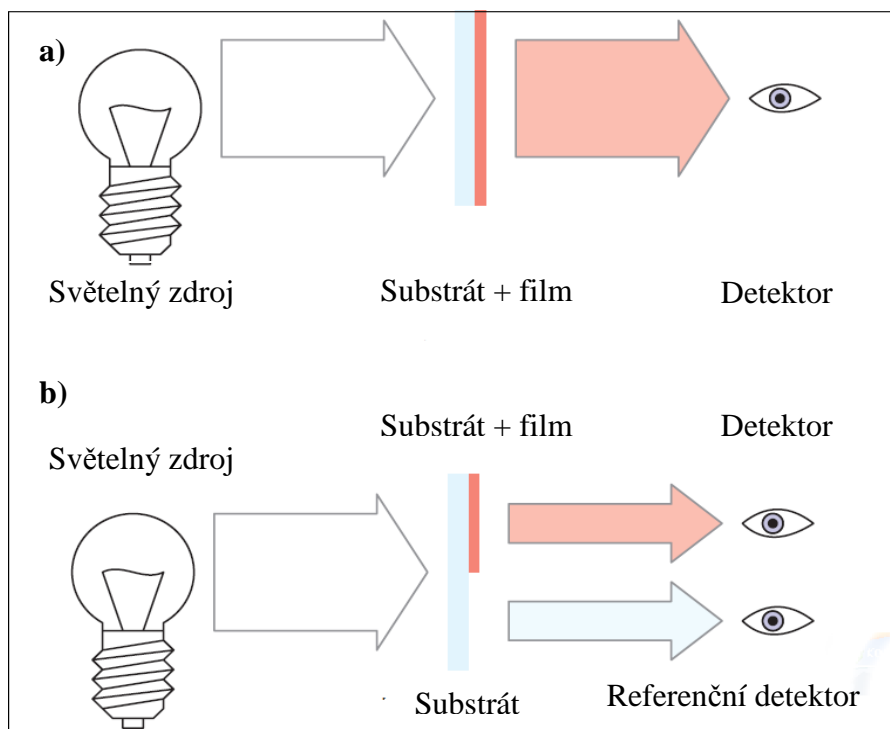
Metodou sol-gel můžeme připravit materiály s velkou variabilitou vlastností: velmi jemné prášky, monolitickou keramiku a skla, keramická vlákna, anorganické membrány, tenké filmy a aerogely [7]. V optice se metoda používá např. pro přípravu porézních vrstev (matric) s imobilizovaným pH převodníkem, kde je cílem získat tenký, porézní a uniformní film plynule spojený se skleněným substrátem. Výsledná vrstva musí být tenká, jednotná a zároveň dostatečně mechanicky odolná. Další oblastí využití je výroba porézních reflexních zrcadel pro reflexní měření pH. Cílem je vyrobit dostatečně porézní a zároveň vysoce reflexní zrcadla [6].

2.5.2 Reflexní metody měření pH

Jak již bylo zmíněno, tyto metody využívají skleněného substrátu s imobilizovaným pH převodníkem. Převodník se na skleněný substrát imobilizuje metodou sol-gel. Vzniklý film reaguje změnou barvy a intenzity fluorescence na změnu pH ve svém okolí (viz. obr. 2.4). Pro účely měření stačí i poměrně tenká vrstva filmu cca 100 nm. Velikost fluorescence závisí na tloušťce filmu a hustotě pH indikátoru uvnitř vrstvy. Reflexní metody měření pH můžeme rozdělit na přímé (transmisní) a nepřímé (reflexní). Obě metody umožňují detekovat poměrně malé změny barvy i intenzity fluorescence s vysokou přesností [5].

Nejjednodušší metodou měření pH je metoda přímá (transmisní). Světlo ze zdroje prochází přímo substrátem s filmem a na výstupu je měřeno výstupní (transmisní) spektrum záření. V zásadě existují dva různé způsoby jak uspořádat měřicí aparaturu a změřit transmisní spektrum. Buď je spektrum světelného zdroje nastavitelné (např. monochromátorem) a detektorem se měří postupně intenzita transmisního záření na jednotlivých vlnových délkách, nebo se použije polychromatický zdroj záření (např. žárovka) a celé transmisní spektrum se změří detektorem. Výhodou prvního způsobu měření je jeho vysoká přesnost, nevýhodou je poměrně dlouhá doba měření (jednotlivé vlnové délky se měří zvlášť, systém potřebuje čas pro nastavení monochromátoru a změření intenzity fluorescence pro danou vlnovou délku). Výhodou druhého způsobu nastavení je velká rychlost měření (celé spektrum se změří najednou v detektoru), nevýhodou je nižší přesnost měření. Transmisní (přímé) měření je citlivé také na několik druhů chyb. Např. pokud se nesleduje (neměří) intenzita světelného zdroje před průchodem filmem, může nestabilní zdroj světla způsobit nesprávné výsledky měření. Tento problém lze jednoduše odstranit referenčním

měřením intenzity světelného zdroje před průchodem filmem. Naměřená intenzita se potom dělí tímto signálem, čímž se koriguje nestabilita světelného zdroje. V praxi je však transmisní spektrum mnohem více ovlivněno skleněným substrátem než nestabilitou zdroje. Tento problém lze odstranit dvěma paprskovým měřením, kdy jeden paprsek prochází substrátem s filmem, druhý jen substrátem (viz obr. 2.9) [5].

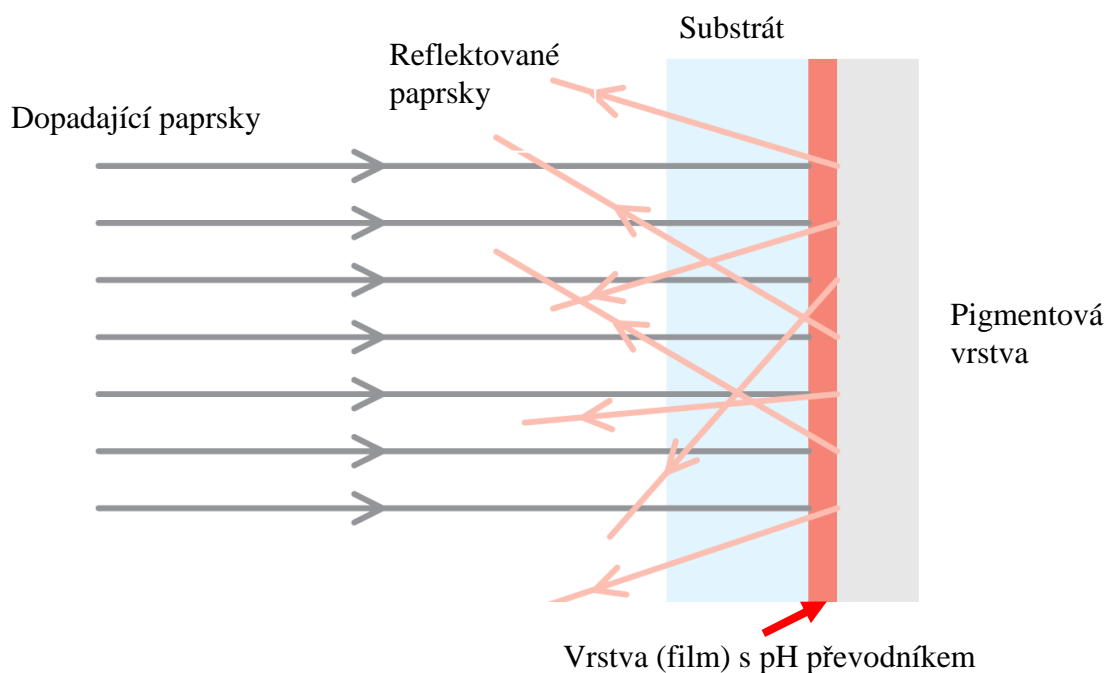


Obr. 2.9: a) klasické transmisní měření b) transmisní měření s dvěma paprsky (podle 5).

Transmisní metody měření mohou být užitečné v některých speciálních aplikacích, běžně se jich však v praxi nepoužívá. Častěji jsou používány Reflexní metody, kdy je substrát s filmem kontaktovaný navíc reflexní vrstvou (obr. 2.10). Reflexní vrstva je v kontaktu s filmem, pH převodníkem a proto musí být propustná pro měřené ionty (H_3O^+ , OH^-). Dostatečně difusní vrstvu můžeme získat pokrytím filmu vrstvou bílého reflexního pigmentu např. TiO_2 či BaSO_4 krystaly. Pokud se má světlo od pigmentových částic více odrážet než rozptylovat, musí být velikost částice podstatně větší než vlnová délka světla. Reflexní mechanismus bílého pigmentu je založen na velkém počtu odrazů od pigmentovaných částic. Pokud je pigmentový prášek vysoce transmisní, reflexe je i při vysokém počtu odrazů prakticky bezztrátová a absorpce je tedy nízká. V ideálním případě probíhá reflexe od pigmentové vrstvy do všech směrů. Avšak aby mohla tato ideální reflexe pigmentové vrstvy nastat, musí uvnitř vrstvy proběhnout velký počet odrazů, a proto musí být vrstva dostatečně silná. Silná vrstva zachytí větší část světla, dopadající světlo se od ní téměř všechno odrazí a nedochází tedy ke ztrátám způsobeným únikem světla do média. Takováto vrstva vyniká

silným, jasným a hladkým odrazem. Problémem této reflexní metody je vybudování silné pigmentové vrstvy s dostatečnou iontovou propustností. Vytvořit silnou a zároveň dostatečně propustnou vrstvu pro ionty H_3O^+ , OH^- je obtížné a technologicky nesmírně náročné [5].

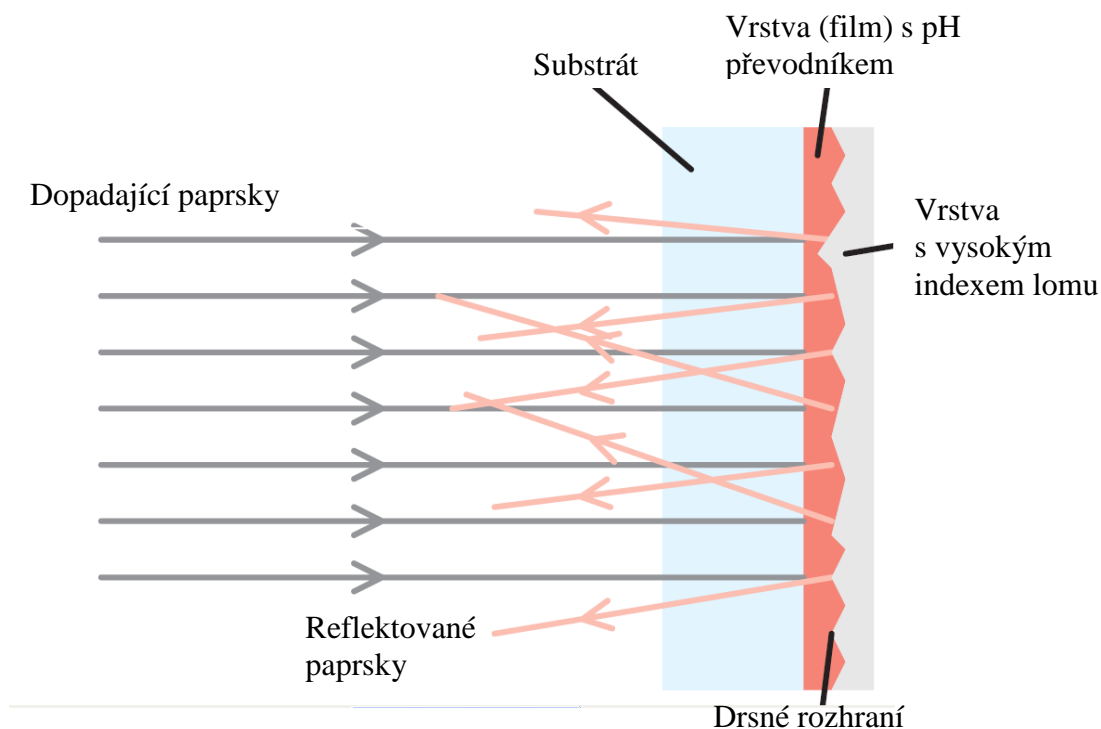
Vzhledem k tomu, že se difusní odraz světla šíří v prostoru do všech směrů, je výhodné umístit detektor detekující odražené záření (fluorescenci) dovnitř integrující koule. Integrující koule způsobí, že každý paprsek po několika odrazech zasáhne detektor, nebo výstupní okénko. Pokud je pigmentová vrstva dostatečně tlustá, prochází jí jen velice málo světla a veškeré světlo v systému se absorbuje jen v tenké vrstvě filmu nebo detektoru. V praxi je potřeba světlo ze zdroje přivést k filmu, k tomuto vedení se nejčastěji používají optická vlákna, v kterých mohou vzniknout nepatrné světelné ztráty. Navzdory výhodám tohoto měřicího systému, systém není snadno realizovatelný (problémy se silnou a zároveň propustnou vrstvou) a proto se také příliš často nepoužívá [5].



Obr. 2.10: Reflexní měření s difusní pigmentovou vrstvou (podle 5).

Jednou z možností jak se vyhnout tlusté reflexní difusní vrstvě je vyrobit difusní reflexní vrstvu s drsným indexem lomu rozhraní. Vrstva filmu je připravena s drsným povrchem a následně potažena povlakem s vysokým indexem lomu (obr. 2.11). Na rozhraní s vysokým a nízkým indexem lomu dochází k značné reflexi světla. Jelikož je rozhraní drsné, reflexe směřuje do náhodných směrů. Touto metodou tedy nedosáhneme Lambertovské distribuce intenzity reflektovaného záření. Také ztráty v systému budou významně vyšší než u předchozí metody. Nicméně opět bude platit, že pro maximální reflexi bude muset být

velikost drsnosti povrchu značně větší než velikost vlnové délky záření. Na druhé straně, jistou výhodou by mohlo být, že povrch filmu nemusí být zcela hladký a vzniklé prasklinky požadované drsnosti by byly naopak žádané. Jistou nevýhodou zůstává, že reflexní vrstva musí být stále poměrně silná i když již ne tak jako v předchozím případě. Podstatnou nevýhodou této metody však je, že v porovnání s předchozí metodou (hladký film) se reflektuje jen pár procent dopadajícího světla. Z tohoto důvodu se tato metoda také příliš často nepoužívá [5].

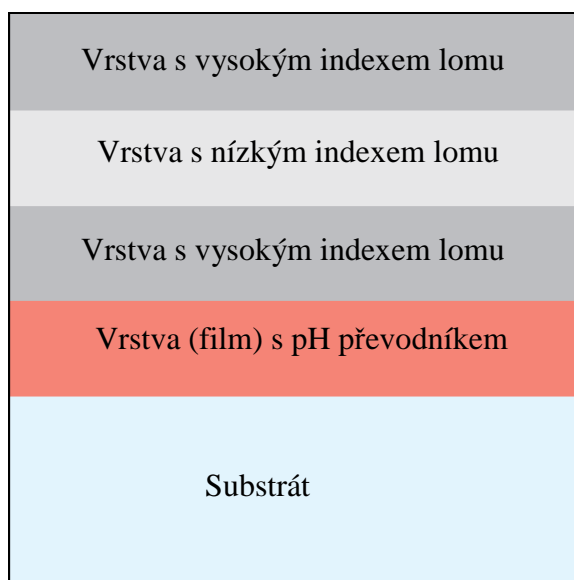


Obr. 2.11: Reflexní měření s difusním drsným rozhraním (podle 5).

Z optického hlediska je výhodné místo reflexní pigmentové vrstvy použít propustné zrcadlo. Difusní povrchy reflektují dopadající záření a fluorescenci do všech směrů bez žádné kolimace a tím znesnadňují sběr záření zpracovací optikou (nutnost používat integrační kouli). Použití zrcadel, kde se úhel dopadu rovná úhlu odrazu usnadňuje další navádění paprsku do zpracovací části měřící aparatury. Reflexní zrcadla se nejčastěji vyrábějí z leštěného kovu. Kov vyniká vysokou odrazivostí a na povrchy se snadno nanáší vakuovými depozičními technikami. Odrazivost kovu je pro reflexní měření pH zcela dostačující. Problém použití kovových zrcadel spočívá tedy ve výrobě kovové vrstvy propustné pro ionty H_3O^+ a OH^- . Řešením by byla výroba zrcadel s malými perforacemi (dírkami). Otázkou je, jaký je optimální počet perforací, jestliže jich bude málo, budou ionty zrcadlem procházet příliš pomalu. Bude-li perforací hodně, budou velice blízko sebe a jejich celková plocha zabere až příliš mnoho z odrazivé plochy zrcadla, celková odrazivost se tedy značně sníží.

Velký počet perforací povede také ke zvýšení plochy exponované vnějším vlivům a pravděpodobnost jejího narušení bude větší. Další neznámou je také otázka vyrobitelnosti takového zrcadla. Prozatím nejsou žádné snadné a levné způsoby výroby vhodně perforovaných zrcadel ve větším množství [5].

Jinou možností je použít zrcadla dielektrická. Vhodná zrcadla se vyrábí spojením několika nevodivých (a tedy transparentních) vrstev s různým indexem lomu (viz. obr. 2.12). Používanou metodou výroby zmíněných zrcadel je metoda sol-gel, která umožňuje výrobu porézních dielektrických vrstev propustných pro ionty H_3O^+ a OH^- . Výsledné porézní zrcadlo se skládá z několika dielektrických vrstev o přijatelné celkové tloušťce v řádu 10 až 100 nm. Technologie umožňuje vyrábět zrcadla s různým indexem lomu. Výhodou dielektrických zrcadel je možnost vyrobit zrcadlo a indikační vrstvu (film s pH indikátorem) stejnou technologií a tedy s minimálními náklady. Proto reflexní metody měření pH se nejčastěji využívají uspořádání s porézními dielektrickými zrcadly [5].

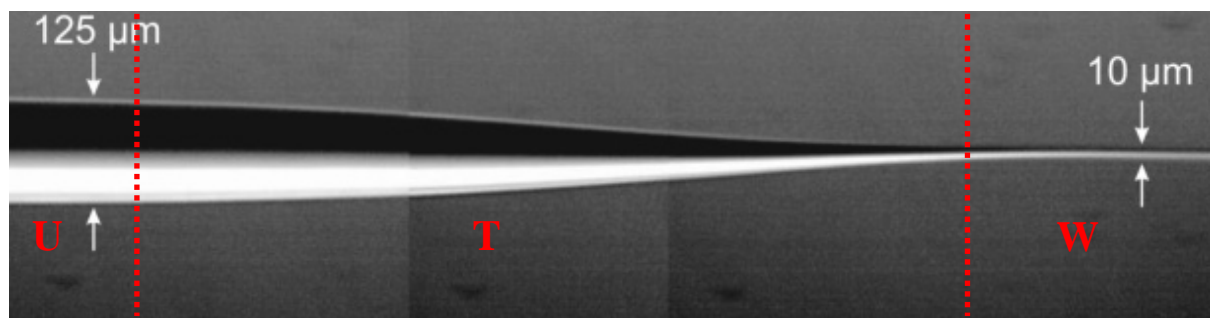


Obr. 2.12: Struktura porézního dielektrického zrcadla s vrstvou filmu na substrátu (podle 5).

2.5.3 Kuželové optické senzory (*Tapered optical sensors*)

Společným základem všech “*taperovaných*” optických senzorů je speciální optické vlákno kónusově zúžené do malého výstupního průměru cca 1-10 μm (taper viz. obr. 2.13) a optický pH převodník imobilizovaný metodou sol-gel na čele kónického zúžení vlákna. Převodník ve vrstvě vytváří na čele vlákna tenký, několik μm silný film reagující změnou intenzity fluorescence na změnu pH ve svém okolí. Optické vláknové “*tapery*” se připravují z komerčně vyráběných optických vláken na “*PC-tapering machine*” kontrolovaným tažením

při teplotě $\sim 1300\text{ }^{\circ}\text{C}$ dosažené plamenem, nebo CO_2 laserem. Jinou možností výroby vláknového *taperu* je chemické selektivní leptání vlákna [9].



Obr. 2.13: Optický vláknový “taper“, část U-single-mode vlákno, T-přechodové stadium, W-ultra tenký konec “taperu“.

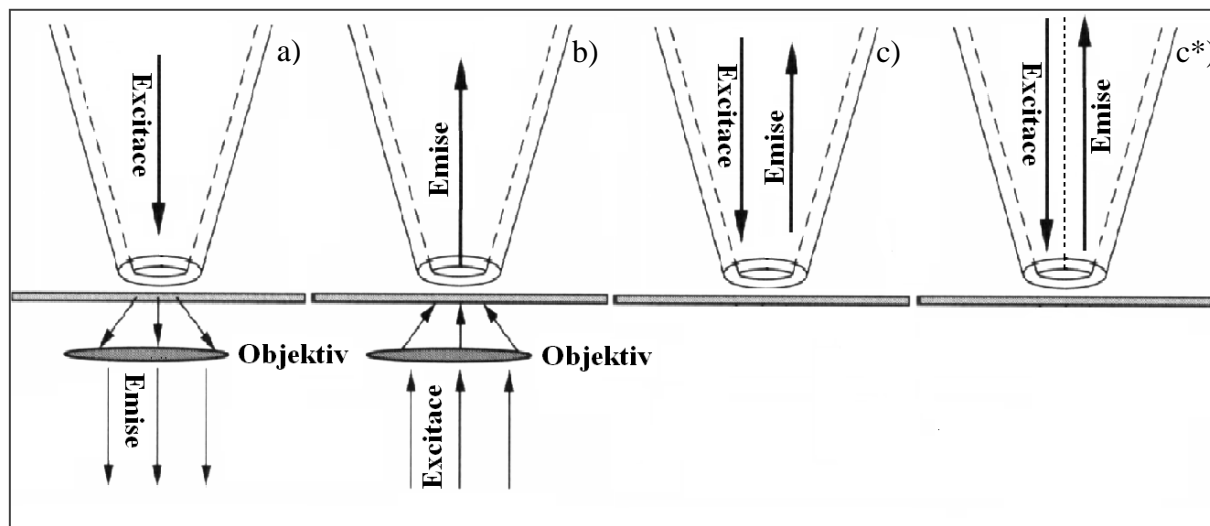
Podle geometrie uspořádání měření klasifikujeme různé metody snímání pH pomocí taperovaných senzorů viz. obr. 2.14 (*tapered optical sensors*):

- Vláknovým taperem je na vzorek přiváděno excitační záření a emisní záření je sbíráno pomocí objektivu inverzního mikroskopu.
- Zkoumaný vzorek je osvětlován např. výbojkou a vláknovým taperem je pouze odváděno emisní záření do detektoru.
- Vláknovým taperem je na vzorek přiváděno excitační a zároveň i odváděno emisní záření.

Nevýhodou metody c) je, že stejnou cestou je vedeno excitační i emisní záření. V taperu se tedy proti sobě šíří jak excitační tak i emisní záření o mnohem nižší intenzitě. Excitační záření o mnohem vyšší intenzitě tedy zastiňuje emisi. Aby takovéto uspořádání mohlo v praxi fungovat, musí být před taperem vložen dělič (*splitter*), který spojuje excitační a emisní větev do taperu. Emisní větev musí být z důvodu minimálních ztrát co nejkratší, ve větvi by mohl být zařazen filtr oddělující excitační záření a na výstupu připojený velice citlivý detektor. Výhodou tohoto uspořádání je jeho jednoduchost, možnost přesného měření v prostoru a mobilnost (odpadá nutnost použití inverzního mikroskopu). Bohužel nevýhody této metody převažují nad jejími výhodami, a proto se v praxi příliš často nepoužívá.

Řešením problému s vedením excitačního i emisního záření taperem je použití speciálního dvoucestného vláknového taperu, tzv. V-taperu (obr. 2.14 c*). Tento taper byl navržen na pracovišti ÚFE Akademie věd ČR, kde byly také zhotoveny jeho první prototypy. Ve spolupráci s firmou SQS Nová Paka se V-taper vyrábí použitím technologie výroby optických vláknových děličů. Povrch V-taperu je také možné bezprostředně po vyrobení pokrýt ochranou a zpevňující vrstvičkou ITO nebo hliníku. V takto vyrobeném V-taperu tedy existují dvě větve pro vedení světla, jedna se používá pro excitaci pH převodníku, druhá pro

snímání emisního záření. Excitační a emisní záření je tedy V-taperem vedeno odděleně [11]. V-taper zachovává výhody vedení excitačního i emisního záření taperem, podstatně zjednodušuje a zpřesňuje detekci emisního záření, zvyšuje rozlišení pH metru. Díky vysoké pevnosti V-taperu, miniaturním rozměrům čela (1-10 μm) a možnosti přesné manipulace V-taperem pomocí mikrometrického x, y, z posuvu je V-taper ideálním nástrojem pro prostorové měření pH v rostlinných buňkách.



Obr. 2.14: Různé metody uspořádání měření s vláknovými optickými tapery.

3 Experimentální část

3.1 Měřicí aparatura

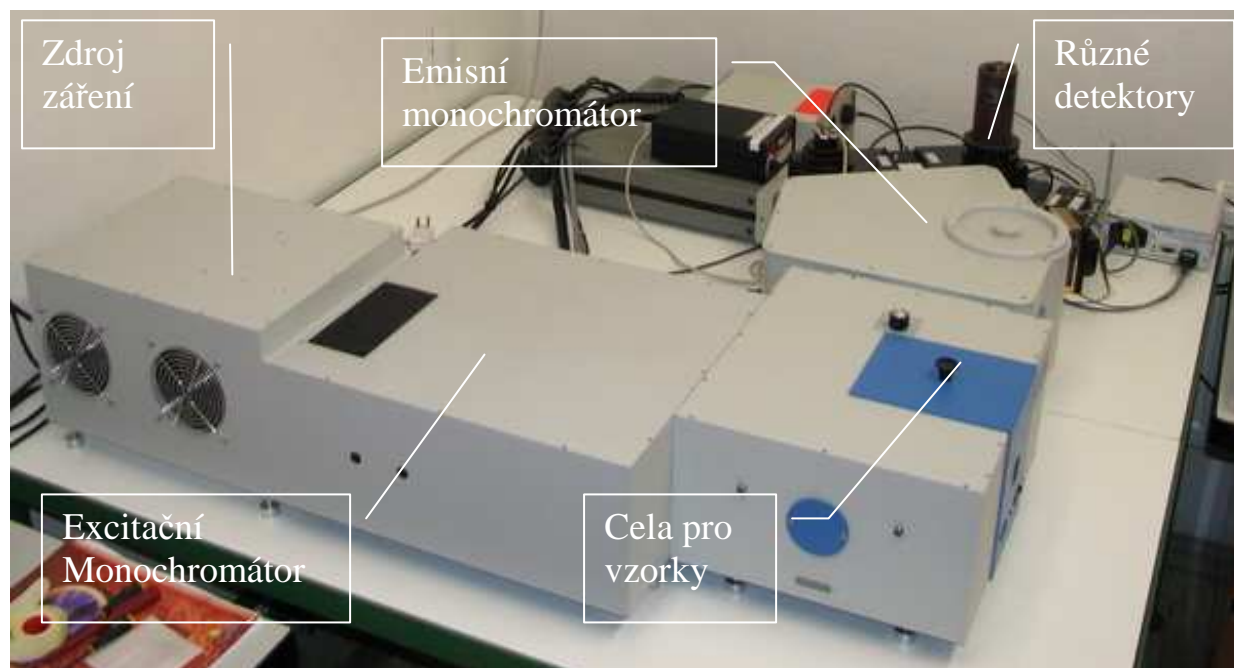
Všechna měření byla realizována v Ústavu fotoniky a elektroniky (ÚFE), na oddělení optických vláken. V experimentech byl používán absorpční spektrometr *Perkin-Elmer Lambda EZ210*⁵, fluorescenční spektrometr *Horiba Fluorolog 3*, vláknový spektrofotometr *Ocean Optics USB2000*, spektrometr *Ando AQ6315*, optické vláknové zdroje (výbojky, lasery, LED), pro mikroskopické snímání V-taperu byl používán mikroskop *Olympus BX-51* s CMOS kamerou *IDS uEye* (3 Mpix).

Excitační a emisní spektra vybraných pH převodníků byla měřena pomocí fluorescenčního spektrometru *Horiba Fluorolog 3*⁶ (obr. 3.15). Spektrometr má modulární konstrukci, skládá se ze zdroje záření, excitačního monochromátoru, cely pro vzorek, emisního monochromátoru a detektoru. Modulární konstrukce umožňuje výměnu jednotlivých modulů a sestavení optimální měřicí aparatury. Můžeme kombinovat různé druhy zdrojů (výbojky, lasery, pulzní nano-mikro sekundové zdroje atd.), monochromátorů (*single-grating*,

⁵ Více informací na : <http://www.perkinelmer.com>

⁶ Více informací na <http://www.horiba.com>

double-grating), filtrů (polarizační, emisní, excitační), detektorů (na pracovišti byl k dispozici čítač fotonů s rozsahem měřených vlnových délek 250-850 nm, InGas detektor s rozsahem 800-1500 nm, PbS detektor s rozsahem 1000-3000 nm), k dispozici je i několik druhů cel pro umístění vzorku. Za zdroj excitačního záření byla během měření používána xenonová výbojka o výkonu 450 W a jako detektor byl používán čítač fotonů (250-850 nm).

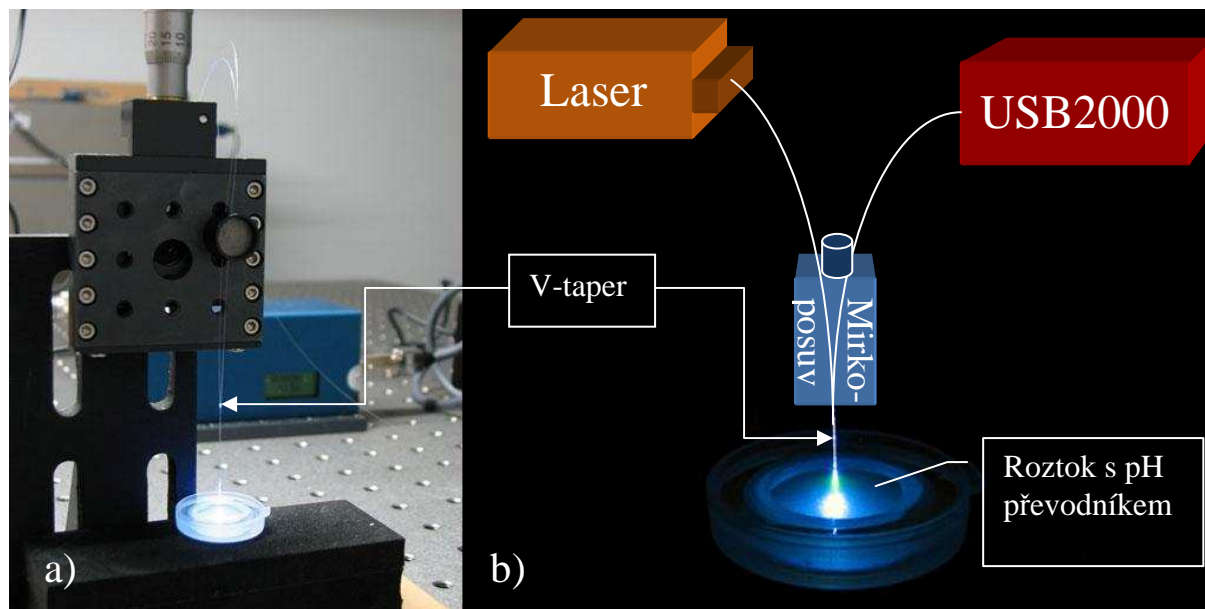


Obr. 3.15: Modulární fluorescenční spektrometr Horiba Fluorolog3.

Fluorolog se ovládal pomocí softwarového programu *FluorEssence*. Program je plně kompatibilní s *Windows*, ukládání naměřených dat je prováděno ve formátu *opf*. (Origin Project Files). Tento formát umožňuje následné přímé zpracování dat programem *Origin*. Program *FluorEssence* umožňuje automatické korekce výkonu lampy a korekce slepého vzorku (*blank correction*). V programu *FluorEssence* můžeme nastavovat typ měřeného spektra (excitační, emisní), můžeme nastavovat excitační, případně emisní vlnovou délku, volit krok a rozsah měření. Dále lze měnit velikost vstupní a výstupní štěrby, integrační čas měření, druh mřížky monochromátoru, typ detektoru. Můžeme volit druh a počet zaznamenávaných signálů a měnit mnoho dalších parametrů přístroje. Během měření máme k dispozici aktuální okno měření (*real time control window*), které nám umožňuje sledovat průběh měření a podle něho okamžitě měnit nastavení *Fluorologu*.

Měřicí aparatura pro měření s V-tapery (obr. 3.16) se skládala z polovodičového diodového laserového zdroje emitujícího na 472 nm, V-taperu umístěného v mikroposuvu (mikroposuv ve směru osy *z*) a detektoru (*Ocean Optics USB2000*). Emisní spektra V-taperu s imobilizovaným pH převodníkem byla měřena pomocí vláknového spektrofotometr *Ocean*

*Optics USB2000*⁷. Spektrofotometr se skládá z CCD čipu s 2048 obrazovými body (*pixels*) obsahuje výkonný 2-MHz analogově digitální (A/D) převodník, programovatelnou elektroniku a vysokorychlostní USB 2 port. Spektrofotometr je velice rychlý, každou milisekundu dokáže zachytit a do paměti uložit celé sejmuté spektrum. Integrační čas detekce signálu je možný měnit v rozsahu 1ms – 5000ms. Rozlišení spektrofotometru je až 0,35 nm (FWHM), kalibrace spektrofotometru probíhá zcela automaticky.



Obr. 3.16: a) fotografie uspořádání měření s V-tapery, na obrázku zachycen laserový zdroj, V-taper v mikroposuvu, roztok s pH převodníkem b) zjednodušené schéma měření s V-tapery, na obrázku je dobře viditelná fluorescence pH převodníku (BCECF).

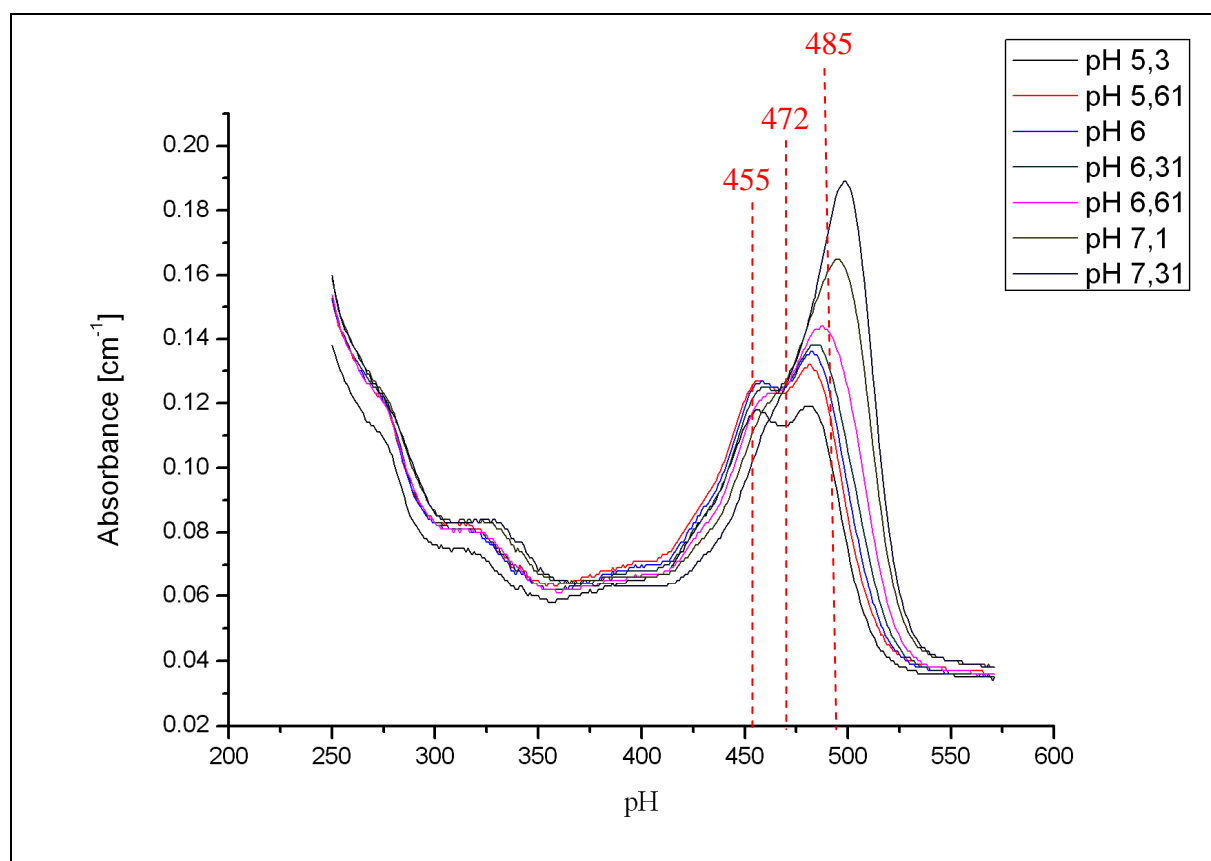
3.2 Absorpční spektra vybraných pH převodníků

Na ústavu Fotoniky a elektroniky (ÚFE) byly pro fixaci na V-taperu vybrány tři teoreticky vhodné pH převodníky 2,7-bis-(2karboxyetyl)-5,6-karboxyfluorescein (BCECF), 8-Hydroxypyrene-1,3,6-Trisulfonic Acid (HPTS) a 6,8-Dihydroxy-1,3-pyrenedisulfonic acid disodium sal (HPCE, viz. kapitola 2.3). Mým úkolem bylo změřit závislost absorpčních spekter vybraných pH převodníků na pH a z naměřených spekter určit pro jednotlivé převodníky vhodné excitační vlnové délky. Absorpční spektra byla měřena absorpčním spektrometrem Perkin-Elmer Lambda EZ210. Spektrometr automaticky koriguje výkyvy ve výkonu lampy (měřený signál je dělený referenčním signálem) a provádí i korekce na slepý vzorek (spektrometr má dvě cesty měření jednu pro vzorek druhou pro slepý vzorek “blank”). Naměřená data spektrometr zobrazuje přímo jako závislost absorbance na vlnové délce.

⁷ Více informací na: <http://www.oceanoptics.com>

Pro výše uvedené měření jsem připravil 3×14 univerzálních Britton-Robinsonových pufrů ze směsi H_3PO_4 , CH_3COOH a H_3BO_3 pro oblast pH 3 až 9 s krokem cca 0,3 pH. Britton-Robinsonový pufr o daném pH se připraví smícháním $x \text{ cm}^3$ NaOH ($0,2 \text{ mol/dm}^{-3}$) a 100 cm^3 roztoku (tzv. základ pufru) H_3PO_4 ($0,4 \text{ mol/dm}^{-3}$), CH_3COOH ($0,4 \text{ mol/dm}^{-3}$), H_3BO_3 ($0,4 \text{ mol/dm}^{-3}$). Pro dosažení konstantní iontové síly $I=0,15$ se přidá k 100 cm^3 pufru m gramů $\text{NaClO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$. Podrobný návod přípravy pufru a potřebné hodnoty x a m jsou uvedeny ve všech chemických tabulkách.

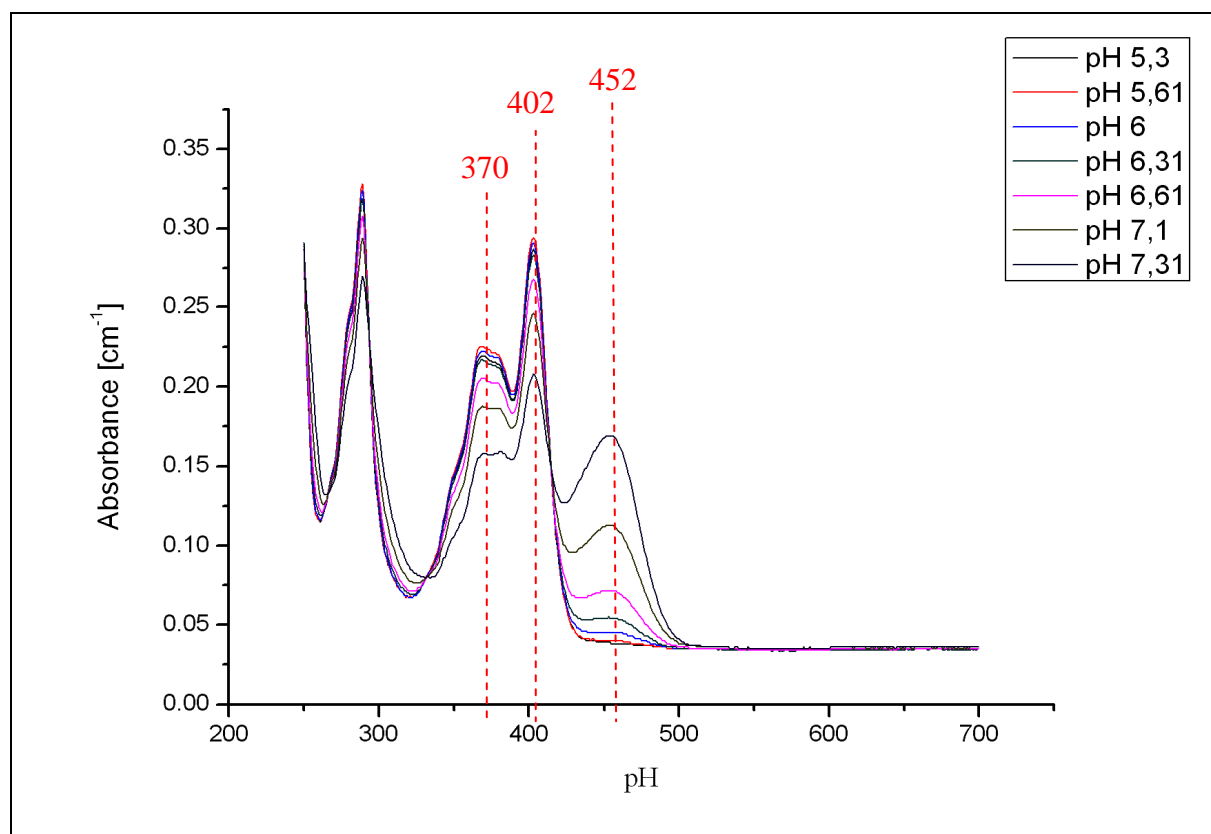
Připravený Základ Britton-Robinsonova pufru byl rozdělen na tři stejné části. V každé části bylo pomocí ultrazvukové míchačky důkladně rozpuštěno x gramů jednoho pH převodníku (BCECF, HPTS a HPCE). Přidáním $x \text{ cm}^3$ NaOH k takto připraveným základům byly sestaveny tři řady kapalných vzorků s rostoucím pH (pH 3 až 9). Absorpční spektra pH převodníků byla měřena v rozsahu 250 až 550 nm, vstupní štěrbina byla nastavena na 1 nm, integrační čas byl 0,1 s. Měřící kyveta byla při každé výměně pufru $3 \times$ vymyta destilovanou vodou a důkladně vysušena suchým NO_2 .



Graf 3.1: Závislost absorbance BCECF na pH v rozsahu 250–575 nm. Červeně vyznačeny vhodné vlnové délky pro excitaci.

Do grafů závislosti absorbance na pH byly pro větší přehlednost vyneseny jen vybrané závislosti pro pH z rozsahu (5,3–7,3). Z výsledků měření závislosti absorbance převodníku

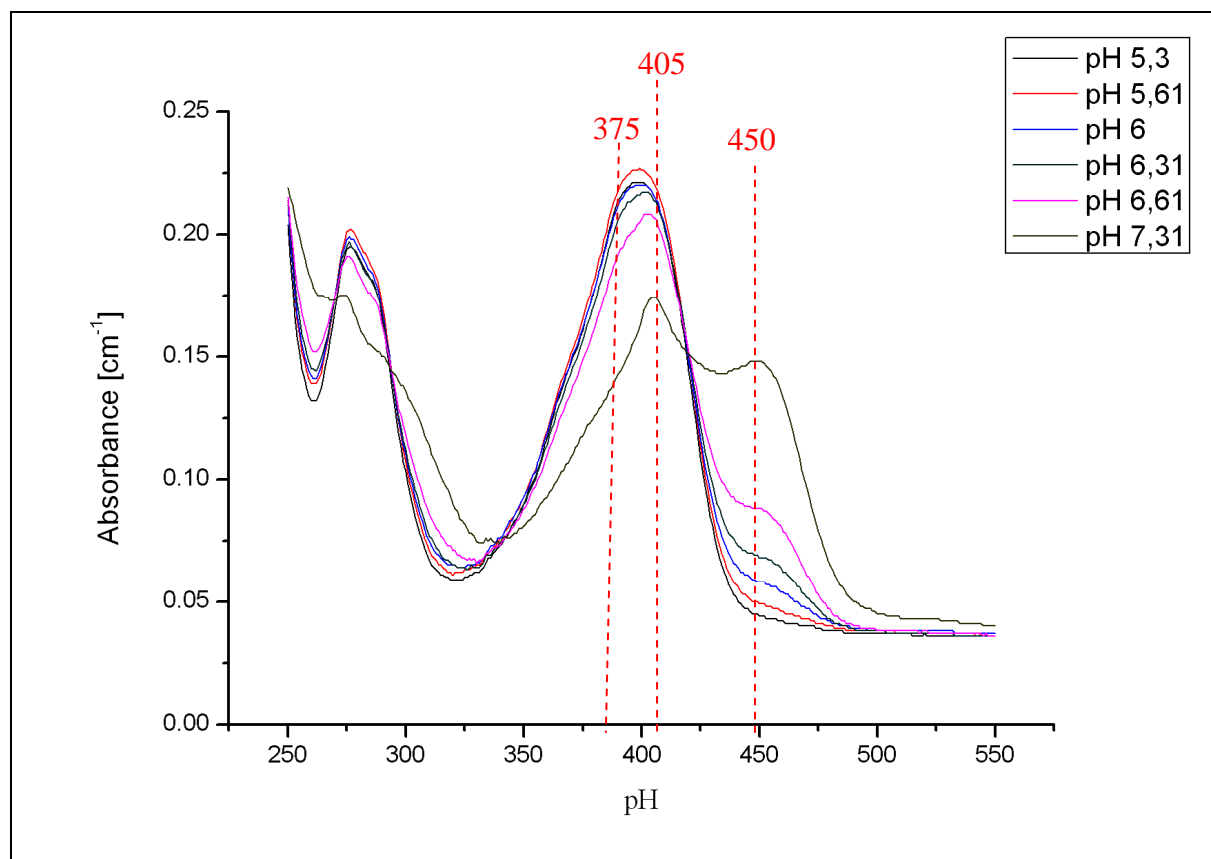
BCECF na pH vyplynulo, že BCECF má dvě významná centra závislosti absorbance převodníku na pH. Tato centra se nalézají v oblasti vlnových délek 455 a 485 nm (graf 3.1). Absorbance na 455 nm s rostoucím pH roste, maximum absorbance v oblasti 485 nm se s rostoucím pH posouvá od 480 nm až k 500 nm, přičemž velikost absorbance kontinuálně stoupá. Díky symetrii absorpčního a fluorescenčního pásu můžeme předpokládat, že emisní spektrum BCECF bude mít podobný tvar jako spektrum absorpční, jen bude posunuto o Stokesův posuv (vit. Kapitola 2.1). Jako vhodné excitační vlnové délky byly vybrány ty, na kterých dochází k největší závislosti absorbance na pH a můžeme u nich tedy předpokládat i podobnou závislost v emisním spektru. S ohledem na požadovanou citlivost výsledného pH detektoru v oblasti hodnot 5 až 7 jednotek pH byly vybrány jako excitační vlnové délky pro poměrové zpracování měření 3 vlnové délky (455, 472 a 485 nm). Vlnová délka 485 nm byla upřednostněna před vlnovými délkami 480 či 500 nm z důvodu lepší závislosti absorbance na pH pro hodnoty z oblasti pH 5 až 7. Vlnová délka 472 nm byla vybrána z důvodu relativně konstantní závislosti absorbance na pH v oblasti hodnot pH 5 až 7 a tedy vhodnosti pro následné poměrové zpracování měření.



Graf 3.2: Závislost absorbance HPTS na pH v rozsahu 250-550 nm. Červeně vyznačeny vhodné vlnové délky pro excitaci.

V absorpční spektrum převodníku HPTS jsou zřetelně rozpoznatelná tři významná centra závislosti absorbance na pH. Tyto centra se nalézají na vlnových délkách 370, 402 a

452 nm (graf 3.2). S rostoucím pH se maximum absorbance na 370 nm a 402 nm snižuje, na 452 nm se naopak maximum s rostoucím pH zvyšuje. Tato protichůdná tendence v absorpčním spektru převodníku se projeví podle zákona symetrie absorpčních a fluorescenčních spekter i ve spektru emisním a bude využita v poměrovém zpracování měření (zvětšení citlivosti). Jako vhodné excitační vlnové délky byly opět vybrány ty, na kterých dochází k největší závislosti absorbance na pH (370, 402 a 452 nm).

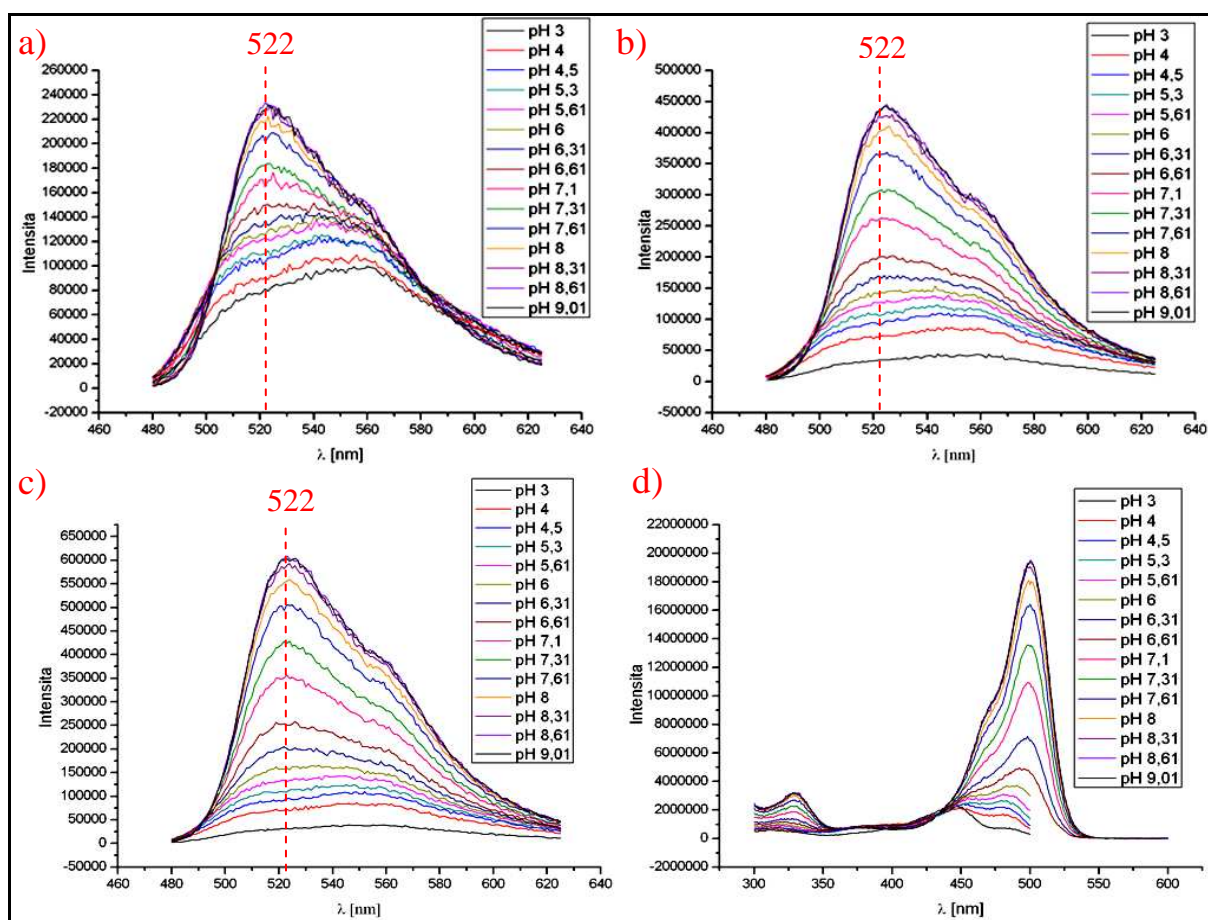


Graf 3.3: Závislost absorbance HPCE na pH v rozsahu 250-550 nm.

V grafu 3.3 závislosti absorbance 6,8-Dihydroxy-1,3-pyrenedisulfonic acid disodium sal (HPCE) na pH jsou patrné tři centra závislosti absorbance na pH. Tato centra se nalézají na 375, 405 a 450 nm. S rostoucím pH se velikost absorbance v oblasti centra kolem 400 nm snižuje a posouvá na vlnovou délku 405 nm, absorbance na 450 nm se současně zvyšuje, na 375 nm se s rostoucím pH objevuje třetí, menší centrum absorbance. Bohužel, změny v absorbanci nejsou přesně pravidelné, např. absorbance na 450 nm je pro pH 9 nižší než pro pH 8. Podobné výkyvy “fluktuace” lze pro různé pH nalézt v celém absorpčním spektru. Otázkou zůstává, jestli jsou tyto výkyvy symetrické, projeví se i v emisním spektru a bude možné je odstranit poměrovým zpracováním měření. Pokud by se ukázalo, že emise převodníku závisí na pH náhodně, jevil by se tento převodník pro další použití jako nevhodný. Za vhodné excitační délky byly vybrány 375, 405 a 450 nm.

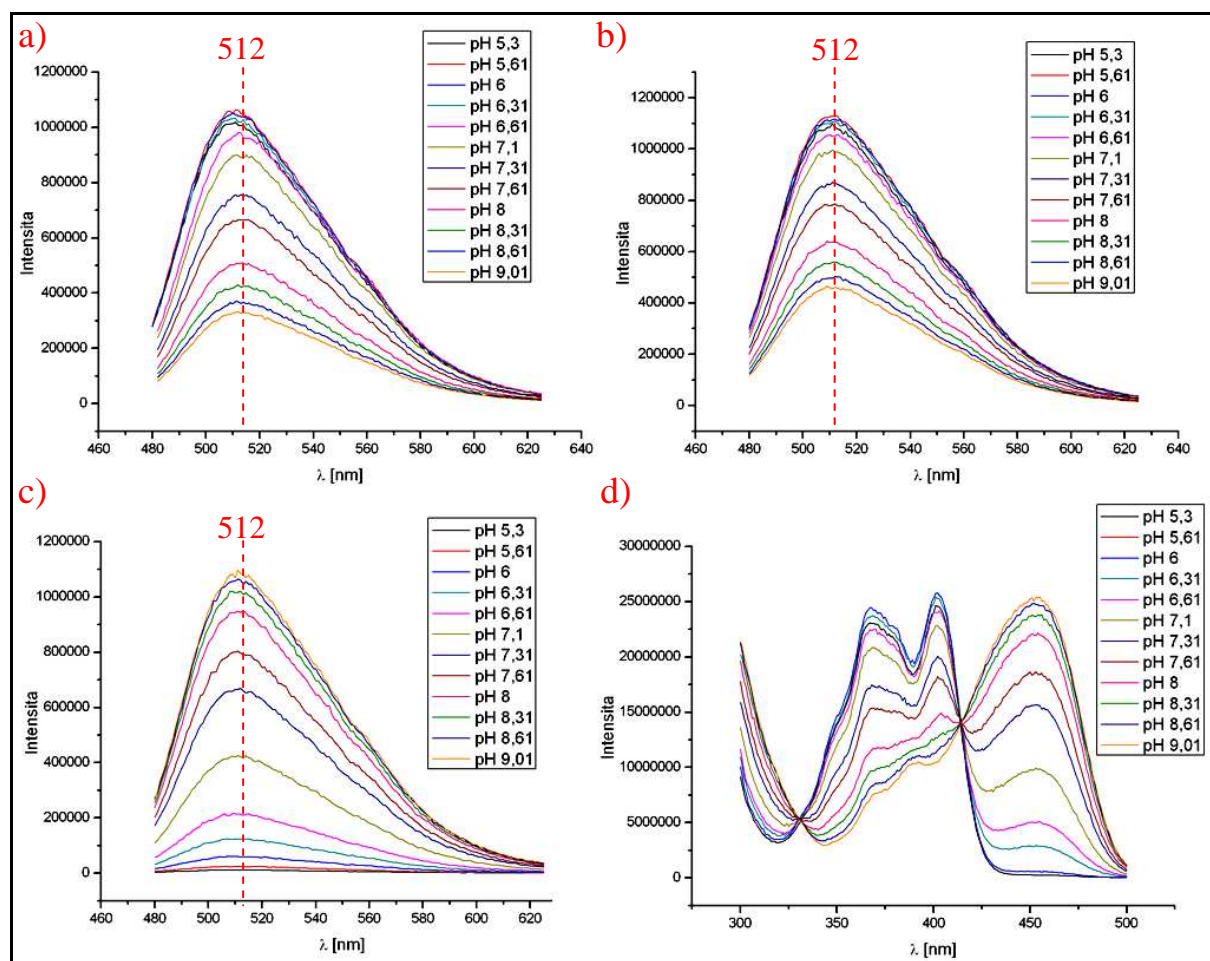
3.3 Excitační a emisní spektra

Excitační a emisní (fluorescenční) spektra vybraných pH převodníků byla měřena modulárním fluorescenčním spektrometrem *Horiba Fluorolog 3* (viz. kapitola 3.1). Fluorescenční spektra byla měřena pro tři roztoky převodníků, převodníky byly rozpuštěny v univerzálním Britton-Robinsonově pufru připraveném v rozsahu hodnot pH 3 až 9 s krokem cca 0,3 jednotky pH. Britton-Robinsonův pufr byl připraven stejným způsobem jako v kapitole 3.2 při měření absorpčních spekter převodníků. Emisní spektra BCECF byla měřena v rozsahu vlnových délek 480-630 nm s krokem měření 1nm (graf 3.4). Převodník byl excitován na 455, 472 a 485 nm. Excitační šterbina byla nastavena na 1nm, emisní na 2 nm. Integrační čas byl nastaven na 0,1 s. V monochromátorech byla použita jemnější mřížka s 1200 vrypy. S rostoucím pH pufrů se zvyšovala i velikost maxim emise převodníku. Maximum fluorescence převodníku (BCECF) se u všech excitačních délek nalézalo na 522 nm. Excitační spektrum BCECF bylo měřeno na 517 nm, převodník byl excitován vlnovými délkami v rozsahu od 300 do 600 nm s krokem 1 nm, nastavení velikosti šterbin, integračního času a monochromátorů *Fluorologu* bylo stejné jako při měření emisních spekter.



Graf. 3.4: a) emisní spektrum BCECF při excitaci na 455 nm b) emisní spektrum BCECF při excitaci na 472 nm c) emisní spektrum BCECF při excitaci na 485 nm d) excitační spektrum BCECF měřené na 517 nm.

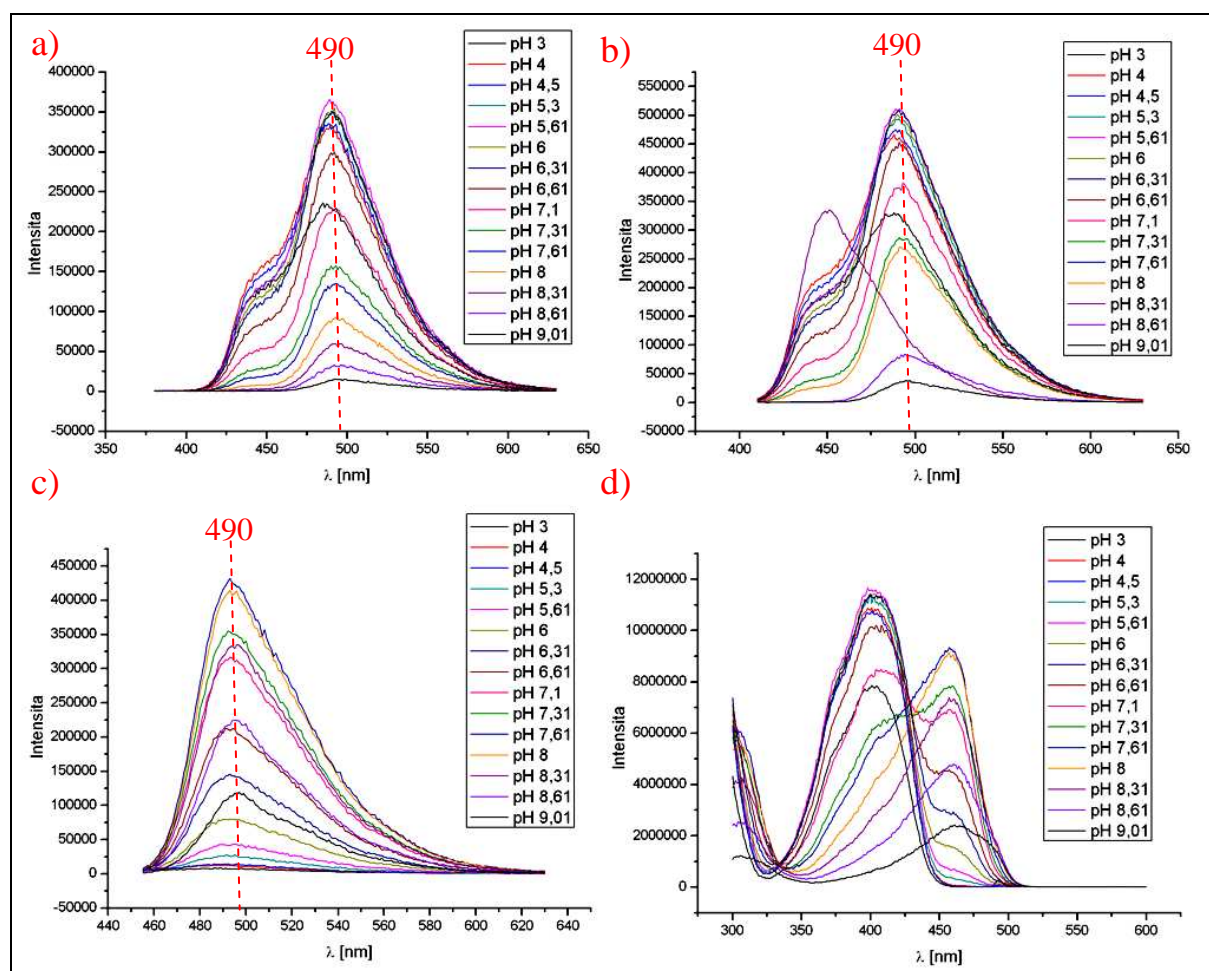
Emisní spektra HPTS byla měřena v rozsahu hodnot pH 5,3 až 9 s krokem cca 0,3 jednotky pH a v rozsahu vlnových délek 480-630 nm s krokem měření 1 nm. Převodník byl excitován na 370, 402 a 452 nm. Excitační spektrum HPTS bylo měřeno na 515 nm, při excitaci vlnovými délkami z rozsahu od 300 do 500 nm s krokem 1nm. Nastavení velikosti štěrbin, integračního času a monochromátorů *Fluorologu* bylo při měření excitačních a emisních spekter HPTS stejné jako při měření spekter BCECF. Maximum fluorescence převodníku (HPTS) se u všech excitačních délek nalézalo na 512 nm. S rostoucím pH pufrů se maxima emise na 370 a 402 nm snižovala, na 452 nm se maxima emise s rostoucím pH naopak zvyšovala (graf 3.5).



Graf. 3.5: a) emisní spektrum HPTS při excitaci na 370 nm b) emisní spektrum HPTS při excitaci na 402 nm c) emisní spektrum HPTS při excitaci na 452 nm d) excitační spektrum HPTS měřené na 515 nm.

Emisní spektra HPCE byla měřena v rozsahu hodnot pH 3 až 9 s krokem cca 0,3 jednotky pH a v rozsahu vlnových délek 380-630 nm s krokem měření 1 nm. Převodník byl excitován na 375, 405 a 450 nm. Excitační spektrum HPCE bylo měřeno na 515 nm, při excitaci vlnovými délkami z rozsahu od 300 do 600 nm s krokem 1nm. Nastavení velikosti

šterbin, integračního času a monochromátorů *Fluorologu* bylo při měření excitačních a emisních spekter HPCE stejné jako při měření spekter BCECF a HPTS. Maximum fluorescence převodníku (HPCE) se u všech excitačních délek nalézalo na 490 nm. S rostoucím pH pufrů se maxima emise na 375 a 405nm snižovala, na 450nm se maxima emise s rostoucím pH naopak zvyšovala (graf 3.6). Převodník HPCE vykazoval podobné chování jako převodník HPTS. Intenzita emise převodníku v závislosti na pH však nerostla pravidelně (stejné chování bylo pozorováno i v absorpčním spektru převodníku), např. intenzita emise na 450nm byla pro pH 8,6 nižší než pro pH 7,3. Podobné výkyvy “fluktuace” byly pro různé pH nalezeny v celém emisním spektru. Můžeme tedy konstatovat, že nepravidelná závislost absorbance na pH, která byla pozorována již v absorpčním spektru, se projevila i ve spektru emisním.



Graf. 3.6: a) emisní spektrum HPCE při excitaci na 375 nm b) emisní spektrum HPCE při excitaci na 405 nm c) emisní spektrum HPCE při excitaci na 450 nm d) excitační spektrum HPCE měřené na 517 nm

3.4 Poměrová technika analýzy spekter

Z naměřených emisních spekter převodníků byly sestaveny závislosti maxim fluorescenční intenzity na pH. Převodníky byly excitovány na třech vlnových délkách a pro každou excitační vlnovou délku byla spočtena závislost maxim emise na pH. Aby mohli být převodníky mezi sebou vzájemně porovnávány, byla emisní spektra převodníků normalizována ke svým maximům. Naměřené hodnoty intenzity emise byly vyděleny maximem emise na dané excitační vlnové délce, $I_{\text{norm}} = I(\text{pH})/I_{\text{max}}$ (maximální intenzita emise se pro různé hodnoty pH po normalizaci pohybovala v rozsahu od 0 do 1). Výsledné závislosti byly vyneseny do grafu (viz. graf č. 3.7 a). Teoreticky by takto získané závislosti mohli být použity jako kalibrační křivky pro kalibraci vyvíjeného pH senzoru. Nevýhodou této kalibrační metody by však byla její závislost na parametrech prostředí (teplotě, iontové síle, atd.) v kterých by se pH senzor používal. Intenzita fluorescence pH převodníku závisí nejen na okolním pH, ale částečně i na okolní teplotě, iontové síle a ostatních, analit nezávislých parametrech. S měnícími se okolními podmínkami by se tedy měnila i maxima intenzity fluorescence převodníku pro různé pH (nezávisle na pH v okolí senzoru), a proto by se před každým použitím pH senzoru musela sestavovat nová kalibrační křivka (teplota, iontová síla prostředí se v závislosti na čase rychle mění) a senzor by se musel znova kalibrovat [12,13].

Řešením problému závislosti kalibrace senzoru na okolních podmínkách je použití poměrového zpracování emisních spekter. Poměrová měření (*wavelength-ratiometric methods*) využívají pro sestavení kalibračních křivek senzorů duálních emisních nebo duálních excitačních indikátorů. Duální emisní indikátory bývají excitovány na jedné vlnové délce a v jejich emisním spektru se vyskytují dvě, i více oblastí závislosti intenzity fluorescence na měřeném analitu. Duální excitační indikátory bývají excitovány na dvou, i více vlnových délkách a jejich emisní spektra bývají také závislá na měřeném analitu. Poměrové zpracování emisních spekter porovnává závislost intenzity fluorescence analitu na dvou (excitačních, nebo emisních) vlnových délkách. Indikátory pH použité v této práci vykazovaly duální excitační vlastnosti. Byly excitovány na třech vlnových délkách a z poměrů maxim intenzity emise pro různé pH byly získány poměrové koeficienty, z kterých byly následně sestaveny poměrové kalibrační křivky [12,13].

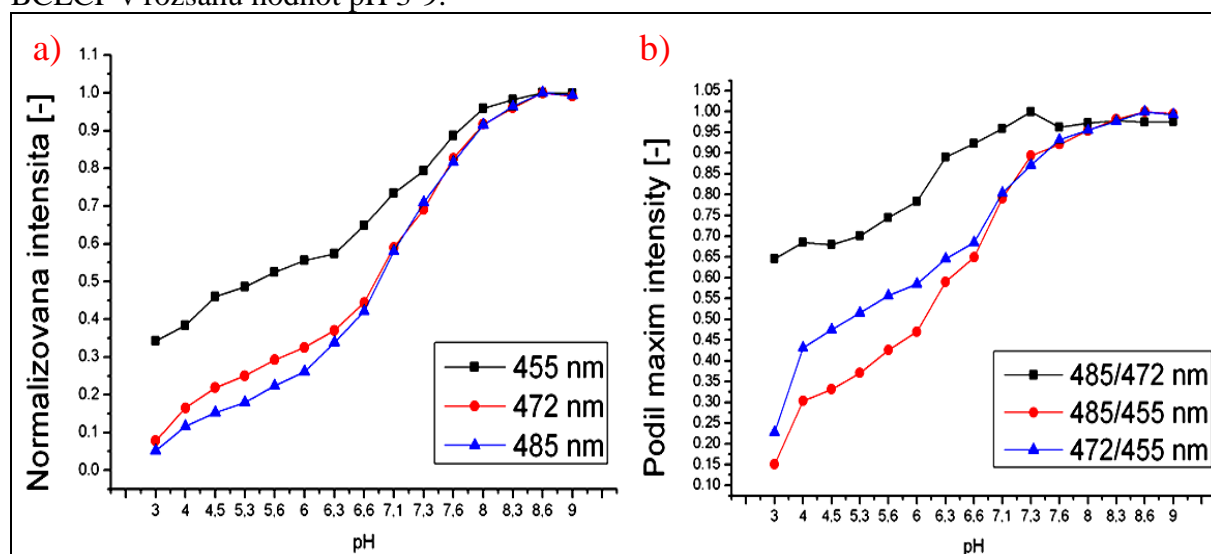
Příkladem poměrového zpracování měření je zpracování emisních spekter převodníku BCECF. Převodník byl excitován na 455, 472 a 485 nm, pro jednotlivé excitační vlnové délky bylo změřeno emisní spektrum. Naměřená emisní spektra byla normalizována ke svým maximům. Z každého spektra byla pro všechny hodnoty pH odečtena maximální hodnota

normalizované intenzity emise. Podělením norm. maxim intenzity emise na dvou excitačních vlnových délkách byly získány poměrové koeficienty. Pro převodník BCECF byly poměrové koeficienty získány z podílu norm. maxim 485/472, 485/455, 472/455 (viz. tabulka č. 3.1, graf č. 3.7 b).

Vliv okolní teploty a ostatních analit-nezávislých parametrů na měřené emisní spektrum bude odstraněn poměrovým zpracováním. Podělením dvou emisních spekter (např. 485/455) se tyto vlivy vzájemně vyruší a výsledné koeficienty budou závislé jen na okolním pH roztoku (předpokládáme, že výkyvy teploty a ostatních analit-nezávislých parametrů způsobí v emisních spektrech (455, 472, 485 nm) stejné změny).

pH	Norm.intenzita max. emise pro 455 nm	Norm.intenzita max. emise pro 472 nm	Norm.intenzita max. emise pro 485 nm	Poměr 485/472 nm	Poměr 485/455 nm	Poměr 472/455 nm
3	0.34195	0.07768	0.05144	0.64522	0.15044	0.22715
4	0.38328	0.16514	0.11617	0.68533	0.30309	0.43086
4,5	0.4601	0.21848	0.15235	0.67938	0.33113	0.47485
5,3	0.48641	0.25066	0.1802	0.70037	0.37046	0.51533
5,6	0.52424	0.29215	0.22315	0.74413	0.42566	0.55728
6	0.55624	0.32508	0.26132	0.78315	0.46979	0.58442
6,3	0.57408	0.37059	0.33874	0.89051	0.59006	0.64554
6,6	0.64866	0.44454	0.42101	0.92267	0.64905	0.68532
7,1	0.73364	0.58997	0.58072	0.95896	0.79156	0.80417
7,3	0.79318	0.69108	0.70936	1	0.89432	0.87128
7,6	0.88646	0.82655	0.81673	0.96266	0.92134	0.93242
8	0.95909	0.91626	0.91512	0.97303	0.95416	0.95534
8,3	0.98242	0.96028	0.96447	0.97848	0.9817	0.97746
8,6	1	1	1	0.97424	1	1
9	0.99842	0.99165	0.99333	0.97589	0.9949	0.99321

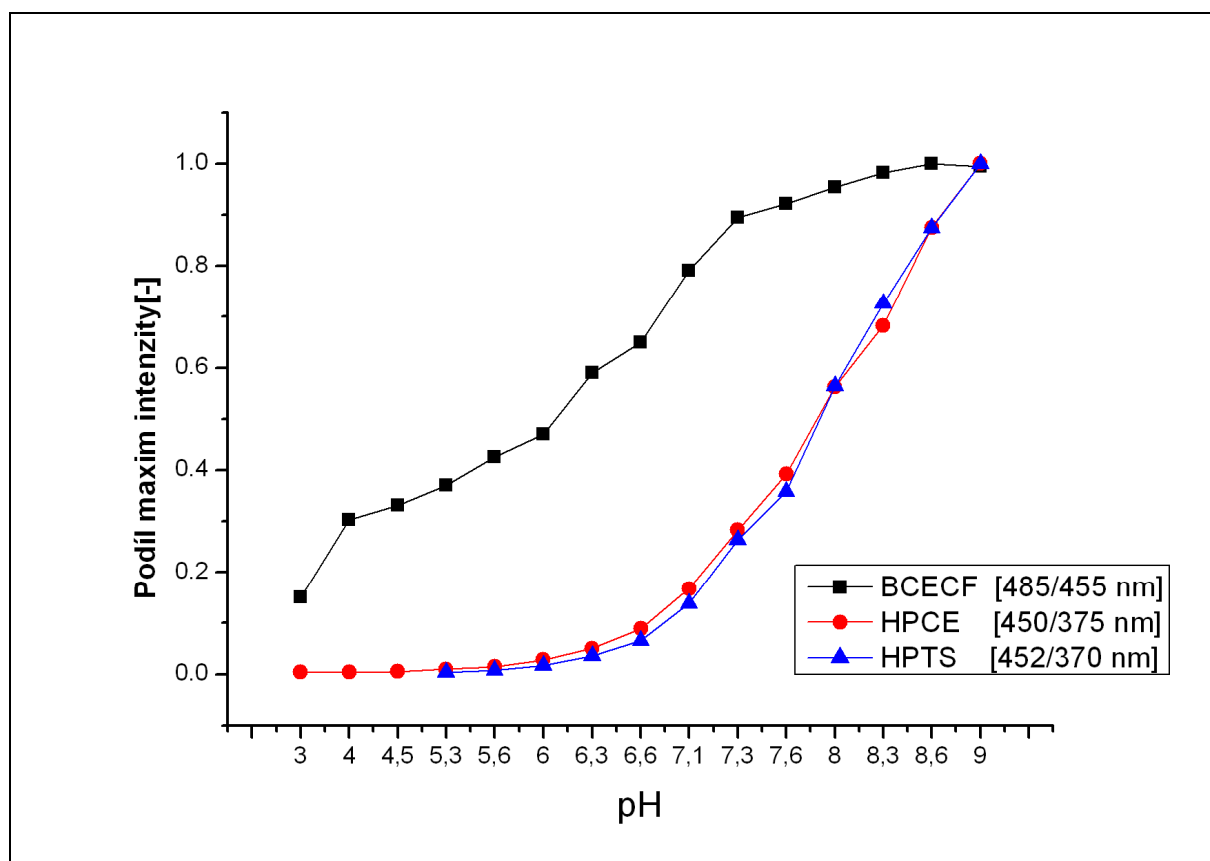
Tabulka 3.1: Normalizované hodnoty maxim emise a poměrové koeficienty pro převodník BCECF v rozsahu hodnot pH 3-9.



Graf 3.7: a) závislost normalizovaných maxim emise BCECF na pH b) závislost poměrových koeficientů BCECF na pH.

3.5 Porovnání poměrových kalibračních křivek pH převodníků

Poměrovou metodou zpracování emisních spekter byly sestaveny kalibrační křivky pH převodníků (BCECF, HPCE, HPTS). Z výsledných kalibračních křivek byly vybrány křivky s nejvyšší směrnicí růstu (strmá závislost poměrových koeficientů na pH → vysoká rozlišovací schopnost senzoru) a ty byly vyneseny do grafu 3.8. Nejvyšší směrnice růstu byla u převodníku BCECF dosažena při poměrovém zpracování intenzit emisních spekter pro 485/455 nm, u převodníku HPCE pro 450/375 nm a u převodníku HPTS pro 452/472 nm. Z tvaru poměrové kalibrační křivky převodníku HPCE můžeme konstatovat, že nepravidelná závislost intenzity emise na pH, která byla pozorována v emisním i absorpčním spektru (viz kap. 3.2 a 3.3) byla symetrická. To znamená, že nepravidelnosti se vyskytovali ve všech emisních spektrech (375, 405, 450 nm) a měly stejný charakter chování, podařilo se je tedy odstranit poměrovým zpracováním měření. Závislost poměrového koeficientu HPCE na pH je tedy již pravidelná (rostoucí) a nejsou u ní pozorovány předchozí fluktuace.

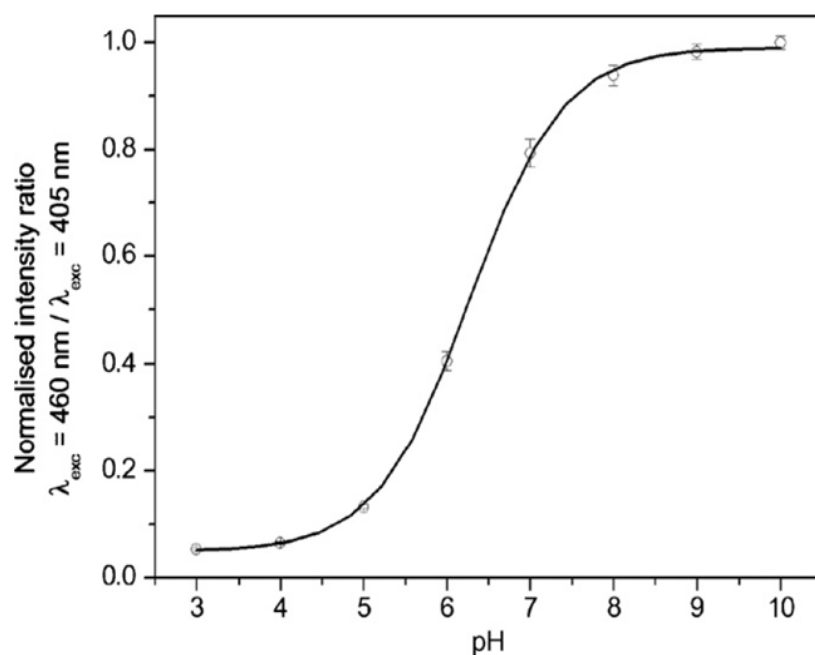


Graf 3.8: Porovnání poměrových kalibračních křivek pH převodníků.

Poměrové kalibrační křivky převodníků HPCE a HPTS mají stejný tvar i stejnou směrnicí růstu. Bohužel v námi požadované oblasti pH (5-7) mají poměrně nízkou závislost poměrových koeficientů na pH. Významná závislost se u nich projeví až v oblasti pH 7-9. Tyto převodníky by tedy byly více vhodné pro použití v této oblasti pH. Ačkoli, v článku

pana MacCraitha zabývající ho se problematikou optických vláknových pH senzorů [13] je převodník HPTS používán pro měření pH i v oblasti pH 5-7 (graf 3.9). Fluorescenční vlastnosti převodníku se pravděpodobně podařilo ovlivnit matricí, v které byl převodník imobilizován. Bylo tedy rozhodnuto, že převodník HPCE bude pro podobnost s převodníkem HPTS a vhodnost použití v oblasti pH 7-9 (významná závislost poměrových koeficientů na pH) z dalších pokusů vyřazen. Převodník HPTS bude dále zkoumán jako vhodný pro použití v naší požadované oblasti pH. Vhodnou imobilizací převodníku se budeme snažit změnit jeho fluorescenční vlastnosti a posunout tak poměrovou kalibrační křivku do nižších hodnot pH.

Převodník BCECF se jeví pro použití v naší požadovaném rozsahu pH jako nejvhodnější. Jeho směrnice růstu není sice tak strmá jako u převodníků HPCE a HPTS. Převodník však vykazuje téměř ideální (lineární) závislost poměrových koeficientů na pH v oblasti pH 4,5 až 7,3 (viz. graf 3.8). Převodníku BCECF bude tedy v dalších měřeních věnována největší pozornost.



Graf 3.9: Závislost poměrového koeficientu HPTS na pH (podle MacCraitha, [13]).

3.5.1 Stabilita převodníku BCECF

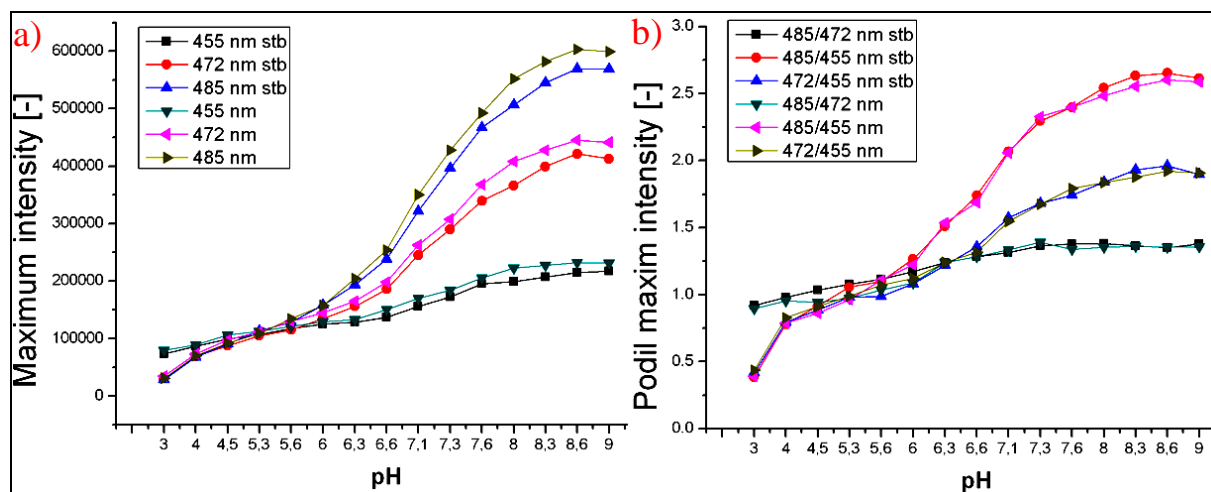
Stabilita převodníku BCECF byla zjišťována opakovaným měřením fluorescence. Měření bylo zopakováno po uplynutí tří týdnů od prvního měření. Převodník byl excitován na 455, 472 a 485 nm. Emisní spektra byla měřena v rozsahu vlnových délek 480-630 nm s krokem měření 1 nm. Nastavení velikosti štěrbin, integračního času a monochromátorů *Fluorologu* bylo při opakovaném měření stejné jako při prvním měření emisních spekter

BCECF (viz. kapitola 3.3). Měření proběhlo ve stejném rozsahu pH (3-9) jako první měření a bylo v něm použito i stejných kalibrační Britton-Robinsonovy pufrů se stejnou koncentrací pH převodníku. Použité pufrы byly před opakovaným použitím po dobu 3 týdnů skladovány v lednici. Před zahájením měření bylo proto nutné zkontrolovat jejich stabilitu. Bylo provedeno kontrolní měření pH připravených pufrů (tabulka č. 3.2).

č. m.	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
I	3	4	4.53	5.3	5.6	6	6.3	6.6	7	7.32	7.6	8	8.3	8.6	9.01
II	3.04	4.05	4.6	5.33	5.62	6.04	6.35	6.63	7.04	7.34	7.58	7.91	8.21	8.54	8.93
III	2.96	3.99	4.49	5.22	5.59	6.02	6.32	6.61	7.02	7.31	7.57	7.91	8.2	8.49	8.94

Tabulka 3.2: Kontrolní měření pH kalibračních Britton-Robinsonových pufrů.

Měření stability pufrů prokázalo, že hodnota pH Britton-Robinsonova pufru zůstává i po 3 týdnech od přípravy pufru konstantní. V tabulce 3.2 jsou vyneseny hodnoty pH pufrů změřené bezprostředně po jejich přípravě (č. I) a po 3 týdnech (č. II – po vyndání z lednice $t = 5^{\circ}\text{C}$, č. III – při pokojové teplotě). Maximální zaznamenaná odchylka od pH změřeného po přípravě pufru byla 0,11 jednotky pH.

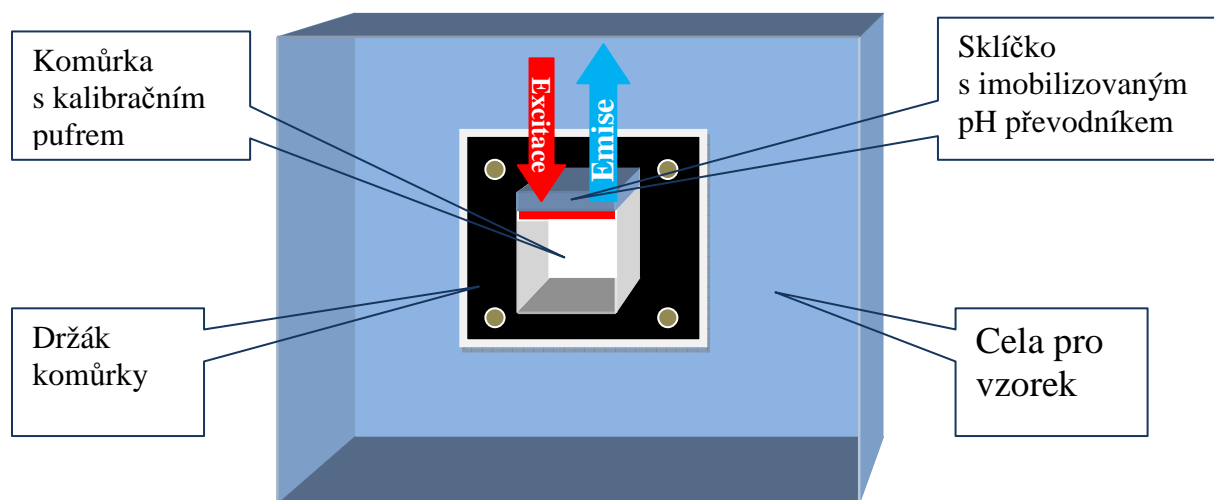


Graf 3.10: a) porovnání závislosti absolutních maximálních intenzit na pH pro tři excitační délky po 3 týdnech b) porovnání závislosti poměrových koeficientů na pH pro tři poměry po 3 týdnech (zkratka *stb* označuje měření provedené po 3 týdnech).

Z grafu 3.10 a) měření stability BCECF vyplývá, že absolutní hodnota fluorescence po třech týdnech mírně poklesla. K maximálnímu poklesu došlo na vlnové délce 485 nm při pH 9 a to o 30548 A. U. Z Grafu 3.10 b) můžeme vyčíst, že poměrové kalibrační křivky převodníku sestavené v den přípravy kalibračních pufrů a kalibrační křivky sestavené z emisních spekter naměřených 3 týdny po přípravě pufrů se významně neliší (jsou téměř totožné). Převodník BCECF rozpuštěný v Britton-Robinsonově pufru vykazuje tedy vynikající stabilitu a jeví se jako vhodný pro konstrukci pH senzoru schopného opakujících se měření pH.

3.6 Měření imobilizovaných pH převodníků

Převodníky (BCECF, HPTS) byly imobilizovány metodou sol-gel (viz. kapitola 2.5.1) na skleněném substrátu (klasické podložní sklíčka používané v mikroskopii). Sklíčko s imobilizovaným pH převodníkem bylo zasazeno do stěny speciální komůrky. Jedna stěna komůrky byla odstraněna a na její místo byly poté umísťovány podložní sklíčka s imobilizovanými pH převodníky. Sklíčka byla na místě fixována akvarijním lepidlem, které zaručovalo vodotěsnost komůrky. Vrstva s imobilizovaným pH převodníkem směřovala dovnitř komůrky, aby mohla být v kontaktu s kalibračními pufrů uvnitř komory. Na dně komory byl vyvrtán otvor, kterým bylo možné odsávat kalibrační pufr. Takto upravená komůrka byla vložena do cely *Fluorologu* pro vzorek (obr. 3.17). Emisní spektra imobilizovaných pH převodníků pak mohla být měřena.



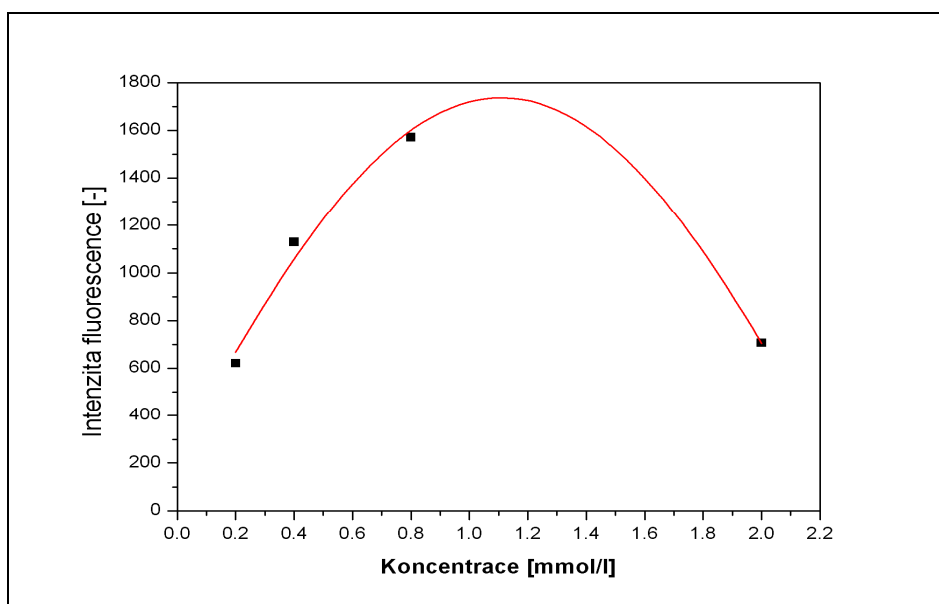
Obr. 3.17: Pohled na komůrku s imobilizovaným pH převodníkem v cele *Fluorologu*.

3.6.1 Imobilizace převodníků do xero-gelových vrstev

V rozpouštědle (etanolu EtOH nebo metanolu MeOH) se nejprve ultrazvukem rozpustil pH indikátor s prekurzorem, nebo směsí prekurzorů. Jako prekurzor byl v této práci používán nejčastěji TEOS (Tetraethoxysilan, $\text{Si}(\text{OC}_2\text{H}_5)_4$) nebo směs dvou prekurzorů TEOSU a glyma (3-Glycidoxypropyltrimethoxysilane). Směs byla připravována v různých poměrech (100% TEOS-0% glyma, 90% TEOS-10% glyma, 80% TEOS-20% glyma, 50% TEOS-50% glyma). Bylo zjištěno, že přidavek glyma má vliv na pevnost a elasticnost vrstvy. Vrstvy vytvořené bez přídavku glyma byly křehčí a méně elastické než vrstvy s glymem. Kvalita adheze na povrch substrátu klesala s rostoucím zastoupením glyma ve směsi. Zvyšování podílu glyma ve směsi však neprokázalo zcela jednoznačný vliv na praskání vrstvy při depozici. Vrstvy s převodníkem BCECF vytvořené ze směsi 90% TEOS a 10% glyma

vykazovaly nejlepší poměr mezi kvalitou adheze a elasticností vrstvy, proto byl tento poměr prekurzorů používán při vytváření vrstev nejčastěji. Byly vytvořeny i vrstvy s jiným prekurzorem (APXES, PTES), ale tyto vrstvy se pro imobilizaci převodníku BCECF v praxi příliš neosvědčily (viz. kapitola 3.6.2).

Po rozpuštění prekurzoru v rozpouštědle se za stálého míchání ke směsi přidal roztok připravený smícháním 1,1 ml etanolu, 1 ml vody a 100 μ l kyseliny chlorovodíkové (HCl). Po smíchání se vzniklý roztok v důsledku hydrolýzy reaktantů mírně zahřál, pH roztoku se pohybovalo kolem hodnoty pH=2. V další fázi přípravy se roztok na míchadle ještě více zahřál, až na $t=70^{\circ}\text{C}$ a po dobu 30 min se neustále promíchával. Po skončení míchání se roztok nechal při laboratorní teplotě 24 hodin dozrát. Přítomnost kyseliny chlorovodíkové v přidaném roztoku způsobí zgelovatění roztoku. Vrstva částečně zgelovatěného roztoku se na mikroskopické sklíčko nanasla technikou dip-coating. Před vytažením zůstávalo sklíčko ponořené po dobu 1-3 minut v roztoku, stupeň tažení byl nastaven na č. 3. Po vytažení sklíčka z roztoku se všechny připravené vzorky sušily 24 hodin při teplotě 80°C a poté ještě dalších 48 hodin při teplotě 100°C nebo 140°C . Není jisté, zda při sušení na 100°C , 140°C nedocházelo k částečnému rozkladu barviva. Použité rozpouštědlo, volba prekurzorů, koncentrace převodníku, poměr H_2O a HCl v roztoku, teplota a doba tvrzení vrstvy mají významný vliv na její výslednou kvalitu. V grafu 3.11 je ukázka závislosti fluorescence vrstvy na koncentraci pH převodníku (BCECF) v prekurzoru (TEOS). S rostoucí koncentrací BCECF v prekurzoru roste i intenzita fluorescence, při koncentraci 1,1 mmol/l je dosaženo max. intenzity fluorescence. Další zvyšování koncentrace převodníku v prekurzoru vede již jen k poklesu intenzity fluorescence vrstvy. Tento pokles je způsoben reabsorpcí vzorku.

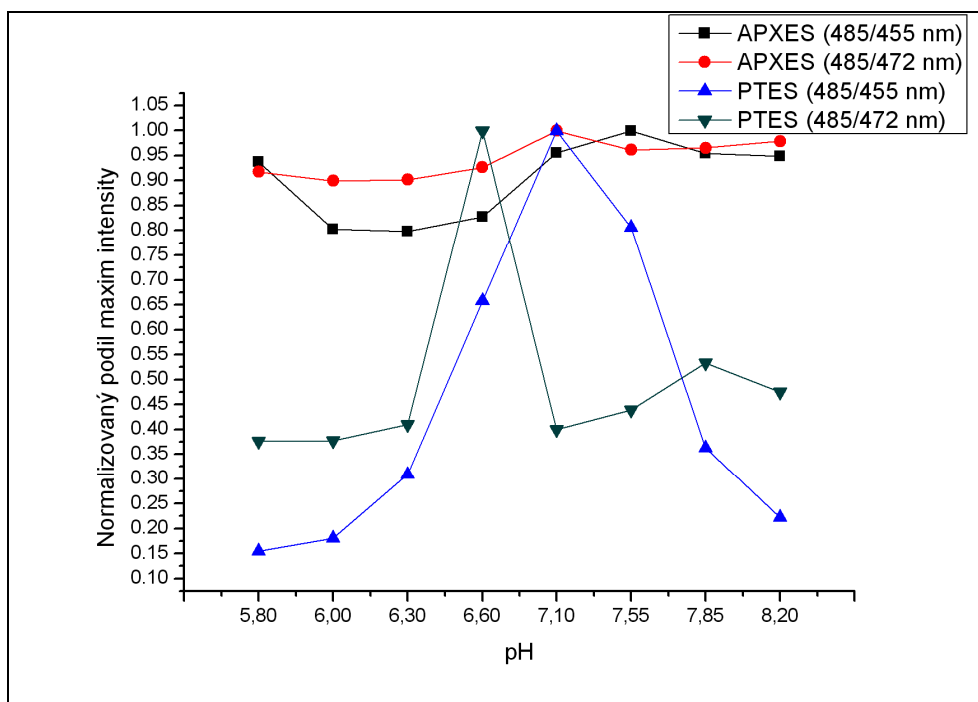


Graf 3.11: Závislost intenzity fluorescence na koncentraci BCECF v prekurzoru (TEOS).

3.6.2 Porovnání xero-gelových vrstev s imobilizovaným převodníkem BCECF

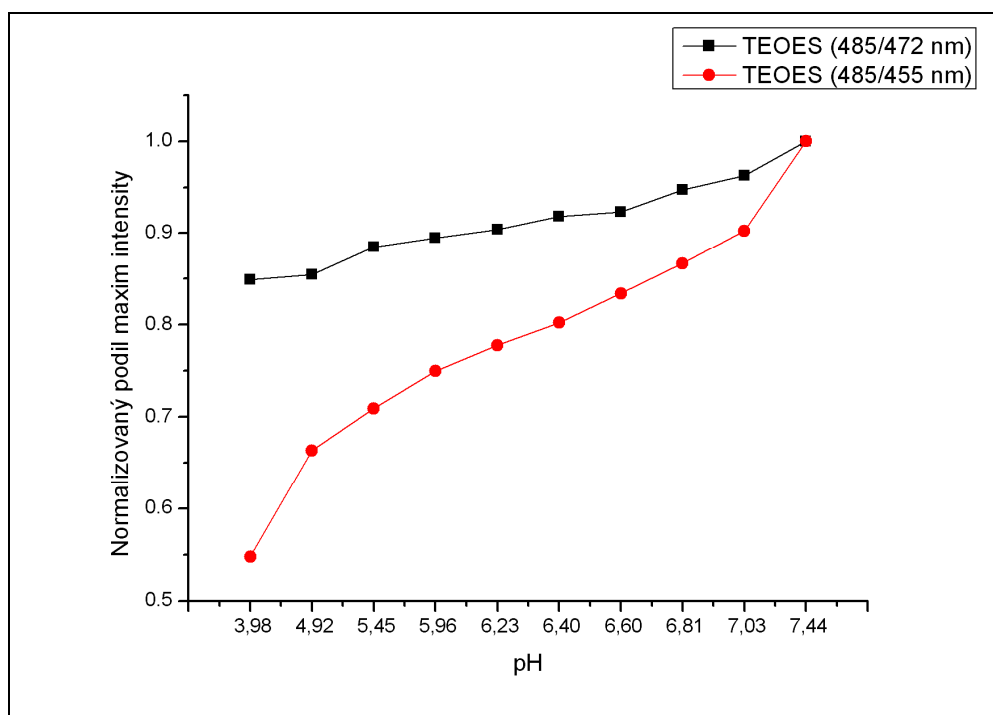
Převodník BCECF byl metodou sol-gel imobilizován do tří xero-gelových vrstev (viz. kap. 2.11.1). Jako prekurzor byl v jednotlivých vrstvách použit TEOS, APXES nebo PTES, prekurzory byly rozpuštěny v etanolu. Vrstvy byly vytvořeny bez přídavku glyma, jednalo se tedy o vrstvy tvořené 100% TEOS, 100% APXES, 100% PTES. Všechny tři připravené vrstvy se sušily 24 hodin při teplotě 80 °C a poté ještě dalších 48 hodin při teplotě 100 °C. Koncentrace BCECF ve vrstvách byla 1,1 mmol/l (optimální koncentrace viz graf 3.11).

Pomocí *Fluorologu3* byly změřeny emisní spektra vrstev. Z naměřených spekter byly sestaveny poměrové kalibrační křivky a ty byly porovnávány. Vrstvy byly excitovány na 455, 472 a 485 nm. Emisní spektra byla měřena v rozsahu vlnových délek 490-650 nm s krokem měření 1 nm. Integračního čas byl z důvodu nižší intenzity fluorescence převodníku ve vrstvě než v roztoku prodloužen na 0,4 s. Ostatní nastavení (velikost štěrbin, druh monochromátoru atd.) *Fluorologu3* zůstalo stejné jako při prvním měření emisních spekter BCECF (viz. kapitola 3.3). Emisní spektra byla měřena pod výstupním úhlem 45°. Měření proběhlo v rozsahu pH Britton-Robinsonových pufrů 5,8-8,20 pro vrstvy APXES, PTES a v rozsahu 3,98-7,44 pro vrstvu TEOS. Pufrů s různými hodnotami pH byly měněny v měřící komůrce (viz obr. 3.17) od nejnižšího pH. Aby nedocházelo ke změnám pH kalibračních pufrů byla komůrka mezi jednotlivými výměnami pufrů vždy promyta roztokem o příslušném pH. Před zahájením vlastního měření emisních spekter byl vždy ponechán čas na reakci převodníku s pufrém, měření bylo spouštěno po uplynutí 45 s od výměny pufru v komůrce.



Graf. 3.11: Porovnání závislosti poměrových koeficientů na pH pro vrstvy APXES A PTES.

Graf 3.11 porovnává kalibrační křivky převodníku BCECF imobilizovaného ve vrstvách APXES a PTES. Kalibrační křivky byly spočteny z poměrů maxim emise 485/455 nm a 485/472 nm. Ve vrstvě APXES mají obě kalibrační křivky podobný průběh, lišící se jen polohou maxima. Maximum křivky sestavené z poměru 485/455 nm je oproti maximu sestavenému z poměru 485/472 nm posunuto směr k vyšším hodnotám pH. Stejný posuv je zaznamenán i u kalibračních křivek vrstvy PTES. I v této vrstvě mají obě sestavené kalibrační křivky podobný průběh. Kalibrační křivky vrstvy APXES vykazují malou nepravidelnou závislost na pH (křivky vykazují fluktuace). Kalibrační křivky vrstvy PTES v závislosti na rostoucím pH nejdříve rostou, poté klesají. Takovýto průběh kalibračních křivek je však nežádoucí. Z naměřených poměrů maxim intenzit se při takovém průběhu nedá jednoznačně určit hodnota okolního pH (jednomu poměrovému koeficientu přísluší dvě rozdílné hodnoty pH). Můžeme tedy konstatovat, že obě použité matrice negativně ovlivnily závislost fluorescence převodníku na pH. V dalších měřeních proto nebudou používány.



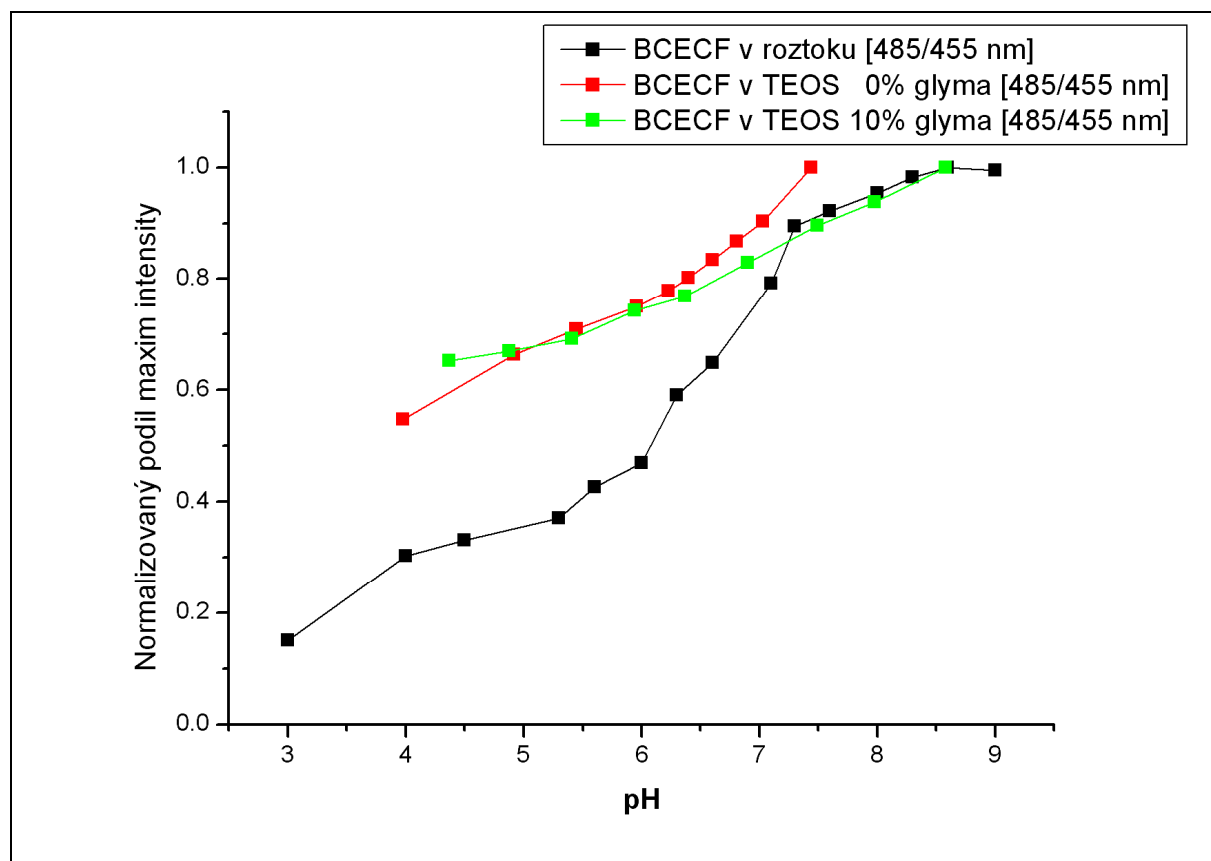
Graf 3.12: Závislosti poměrových koeficientů na pH pro vrstvu TEOS.

V grafu 3.12 jsou vyneseny závislosti poměrových kalibračních křivek převodníku BCECF imobilizovaného ve vrstvě TEOS. Kalibrační křivky byly stejně jako u vrstev APXES a PTES spočteny z poměrů maxim emise 485/455 nm a 485/472 nm. Obě kalibrační křivky vykazují rostoucí, v rozsahu pH (4,92-7,03), lineární závislost na pH. Kalibrační křivka pro poměr 485/455 nm má vyšší směrnici růstu, vykazuje strmější závislost na pH a umožní jemnější (přesnější) kalibraci pH senzoru. Matrice TEOS ovlivňuje fluorescence pH

převodníku méně než matrice APXES a PTES. Kalibrační křivky sestavené z poměrů maxim emise, zejména z poměru 485/455 nm se jeví jako velice vhodné pro kalibraci vyvíjeného pH senzoru. V dalších měření bude proto převodník BCECF imobilizován jen v matrici TEOS, případně TEOS+glymo.

3.6.3 Porovnání kalibračních křivek převodníku BCECF rozpuštěném v pufrch a imobilizovaném v TEOS

Poměrové kalibrační křivky převodníku BCECF sestavené z emisních spekter naměřených na kalibračních pufrch s rozpuštěným převodníkem byly porovnávány s kalibračními křivkami naměřenými na podložním sklíčku s imobilizovaným převodníkem (TEOS, TEOS+10% glama). Připravené vrstvy se sušily 24 hodin při teplotě 80 °C a poté ještě dalších 48 hodin při teplotě 100 °C. Koncentrace BCECF ve vrstvách byla 1,1 mmol/l. Převodník byl excitován na 455, 472 a 485 nm, poměrové koeficienty byly sestaveny z poměru 485/455 nm.



Graf 3.13: Porovnání závislosti poměrových koeficientů na pH pro převodník BCECF rozpuštěný v pufrch a imobilizovaný v TEOS a TEOS +10% glama na podložním sklíčku.

V grafu 3.13 jsou vyneseny závislosti poměrových koeficientů (485/455 nm) na pH pro převodník BCECF rozpuštěný v pufrch (černá křivka) a imobilizovaný ve vrstvě TEOS

(červená křivka) a ve vrstvě TEOS+10% glyma (zelená křivka). Imobilizace převodníku do vrstvy způsobila změnu závislosti poměrových koeficientů na pH. Poměrové koeficienty imobilizovaných převodníků jsou více lineárně závislé než poměrové koeficienty převodníku rozpuštěného v roztoku (kalibrační pufrů). Spočtené poměrové koeficienty převodníku rozpuštěného v roztoku se pohybovaly pro pH 4-7,5 v rozsahu 0,3-0,9, převodníku imobilizovaného v TEOS v rozsahu 0,5-1, převodníku imobilizovaného v TEOS+10% glyma v rozsahu 0,6-0,9. Celkový rozsah v dané oblasti pH se tedy zmenšil z 0,6 na 0,5 u převodníku imobilizovaném v TEOS a na 0,3 u převodníku imobilizovaném v TEOS+10% glyma. Zmenšení rozsahu způsobí změny v přesnosti stanovení pH, aby mohlo být pH určeno s přesností na 0,2 jednotky pH musí se zvýšit přesnost stanovení poměrových koeficientů. Pro určení pH s přesností na 0,2 jednotky pH se musí poměrové koeficienty převodníku rozpuštěného v roztoku lišit o 3,4 %, převodníku imobilizovaném v TEOS o 2,8 %, převodníku imobilizovaném v TEOS+10% glyma o 1,7%.

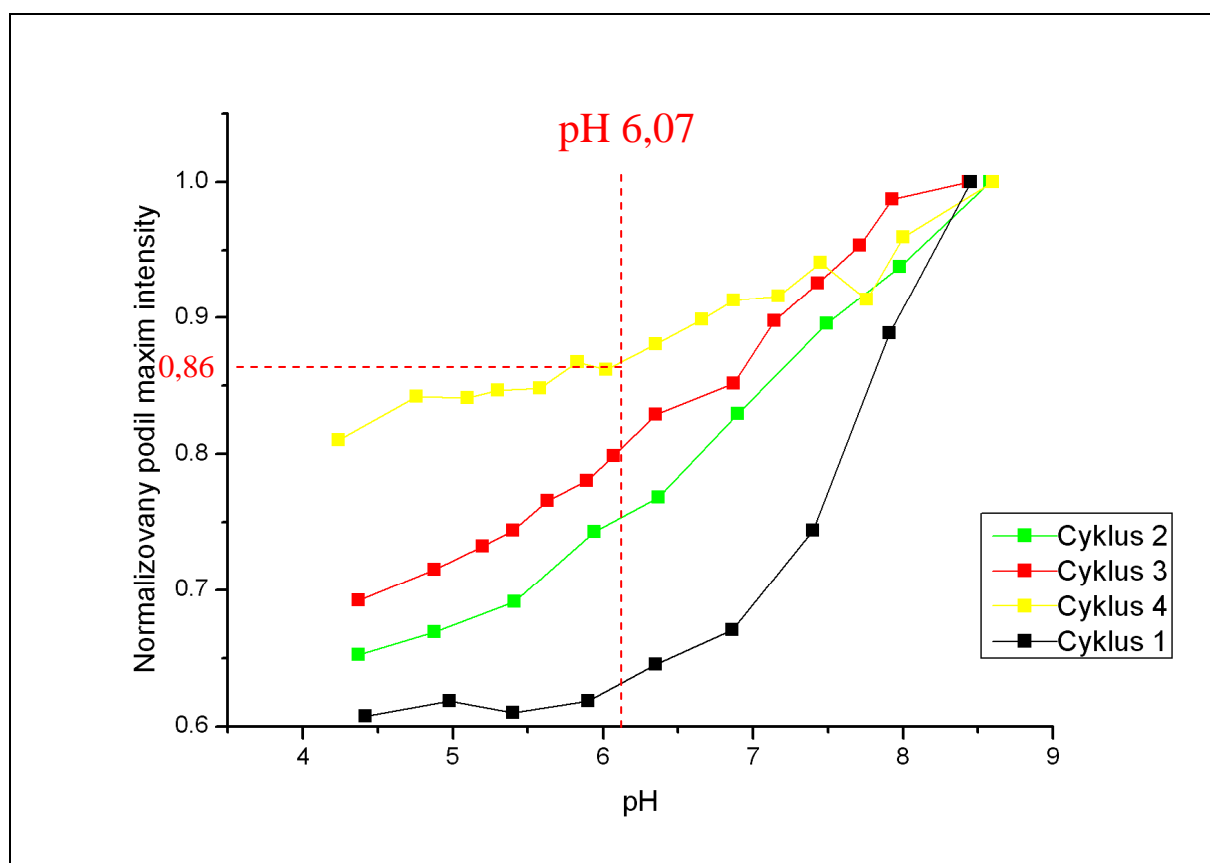
Imobilizace převodníku do vrstvy při zachování přesnosti stanovení poměrových koeficientů (přesnosti měření intenzity emise) tedy způsobí snížení rozlišovací schopnosti pH senzoru.

3.6.4 Ověření stability převodníku BCECF ve vrstvě (TEOS)

Převodník BCECF byl metodou sol-gel imobilizován do xero-gelové vrstvy. Jako prekurzor této vrstvy byla použita směs prekurzorů připravená z 90% TEOSu a 10% glyma. Směs prekurzorů byla rozpuštěna v etanolu (EtOH). Připravená vrstva se sušila 24 hodin při teplotě 80 °C a poté ještě dalších 48 hodin při teplotě 140 °C. Koncentrace BCECF ve vrstvě byla 1,1 mmol/l.

Vrstva byla excitována na 455, 472 a 485 nm. Emisní spektra byla měřena v rozsahu vlnových délek 485-600 nm s krokem měření 1 nm. Integračního čas byl opět z důvodu nižší intenzity fluorescence převodníku ve vrstvě než v roztoku prodloužen na 0,4 s. Ostatní nastavení (velikost štěrbin, druh monochromátoru atd.) *Fluorologu* zůstalo stejné jako při prvním měření emisních spekter BCECF (viz. kapitola 3.3). Emisní spektra byla měřena pod výstupním úhlem 45°. Měření proběhlo v rozsahu pH Britton-Robinsonových pufrů 4,2-8,6 a bylo realizováno ve čtyřech cyklech. První cyklus měření proběhl ihned po zatvrdnutí vrstvy, druhý a třetí cyklus proběhl po uplynutí jednoho dne od prvního měření. Mezi druhým a třetím cyklem uplynuly cca 4 hodiny. Čtvrtý cyklus proběhl po třech dnech od prvního měření. Z naměřených emisních spekter byly sestaveny závislosti poměrových kalibračních křivek na pH, křivky byly normalizovány ke svému maximům a vyneseny do grafu 3.14.

Poměrové koeficienty byly sestaveny z poměru 485/455 nm. Poměr maxim emise na těchto excitačních délkách vykazuje dlouhodobě nejvyšší směrnici růstu. Ke kalibračním pufrům čtvrtého cyklu měření bylo přidáno i kontrolní médium simulující pH a prostředí panující uvnitř rostlinné buňky. Cílem měření bylo změřit pH média a porovnat naměřenou hodnotu pH s hodnotou pH změřenou skleněnou potenciometrickou elektrodou. Emisní spektrum média bylo měřeno při excitaci na 485 a 455 nm. Z poměrů maxim emise 485/455 nm byl získán poměrový koeficient a z kalibrační křivky 4 cyklu byla odečtena příslušná hodnota pH (graf 3.14). Odečtená hodnota odpovídala pH 6,07.



Graf 3.14: Normalizované poměrové kalibrační křivky převodníku BCECF. Převodník byl imobilizovaný ve vrstvě TEOES s přidávkou 10% glyma. Měření proběhlo ve čtyřech cyklech. Červeně je vyznačeno odečtení pH kontrolního média z kalibrační křivky čtvrtého cyklu měření.

V grafu 3.14 jsou vyneseny čtyři kalibrační křivky imobilizovaného převodníku. Černá křivka odpovídající prvnímu měření vrstvy vykazuje v oblasti pH 4-6 malou závislost poměrových koeficientů na pH. Závislost se však výrazně zvýší při opakovaném měření stejné vrstvy (cykly 2, 3 a 4). Toto zvýšení (změna chování vrstvy) můžeme přičíst změnám ve struktuře vrstvy způsobeným vystavením vrstvy vysokým hodnotám pH (pH blízké 9). Takto vysoké hodnoty pH pravděpodobně způsobily přeměnu vnitřní stavby vrstvy. Vrstva se po kontaktu s vysokými hodnotami pH aktivovala a ostatní kalibrační křivky (cykly 2, 3 a 4)

mají významnou lineární závislost poměrových koeficientů na pH i v oblasti nízkých hodnot pH. Kalibrační křivky druhého a třetího cyklu si jsou velice podobné, mají vysokou směrnici růstu a téměř lineární závislost poměrových koeficientů na pH. Křivky však nejsou totožné, pro stejné hodnoty pH mají jiné poměrové koeficienty a to i přesto, že cykly proběhly jen v odstupu cca 4 hodin. Tato variabilita kalibračních křivek svědčí o nestálosti vrstvy. Kalibrační křivka čtvrtého cyklu vykazuje výrazně nižší směrnici růstu. Pravděpodobně došlo k částečnému vymýtu převodníku z vrstvy (Dye leaching) a tedy k snížení celkové intenzity fluorescence.

Z výsledku měření vyplynulo, že se vrstva před kalibrací musí aktivovat vysokými hodnotami pH (pH kolem hodnoty 9). Aktivace lze dosáhnout prostým ponořením vrstvy do pufru o $\text{pH} = 9$. Dále byla prokázána značná nestabilita vrstvy. Nestabilita vrstvy způsobuje změny v intenzitě fluorescence, změny emisních spekter a tedy i změny kalibračních křivek. Toto chování znemožňuje použití jedné kalibrační křivky pro kalibraci pH senzoru. Pokud by problém se stabilitou vrstvy nebyl vyřešen, musel by se senzor před každým měřením znova kalibrovat. Neustálá nutnost kalibrace senzoru by pravděpodobně značně zkomplikovala jeho využití v praxi.

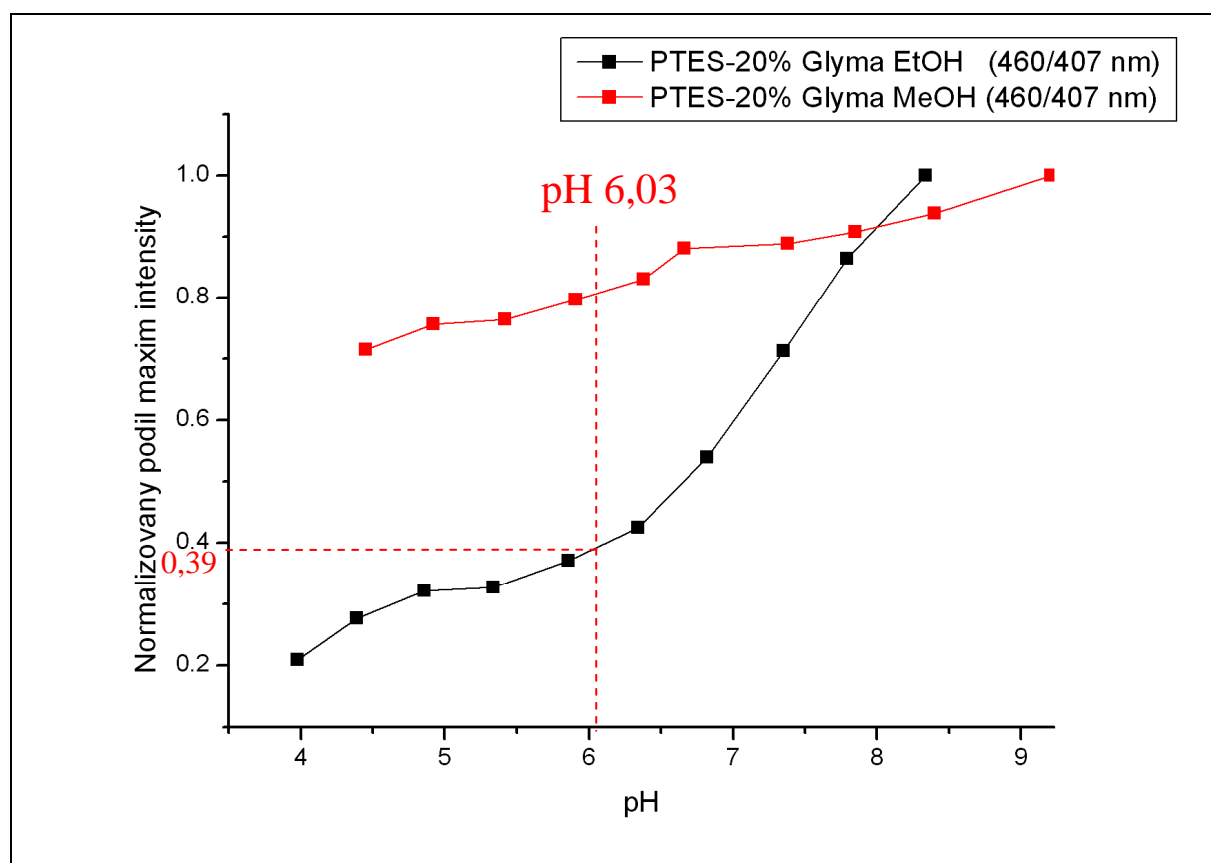
Odečtené pH média bylo 6,07 a od pH změřeného potenciometricky se lišilo o 0,77 jednotky pH. Potenciometricky změřené pH odpovídalo hodnotě 5,3. Neshoda mezi námi naměřenou hodnotou pH a hodnotou získanou potenciometricky je vysoká, ale její důvody nejsou prozatím známy.

3.6.5 Porovnání xero-gelových vrstev s převodníkem HPTS

Převodník HPTS byl metodou sol-gel imobilizován do xero-gelových vrstev. Jako prekurzor vrstev byla použita směs prekurzorů připravená z 80% PTES a 20% glyma. Směs prekurzorů byla rozpuštěna v etanolu (EtOH) i metanolu (MeOH). Připravené vrstvy se sušily 24 hodin při teplotě 80 °C a poté ještě dalších 48 hodin při teplotě 140 °C. Koncentrace HPTS ve vrstvách byla 1,6 mmol/l.

Pomocí *Fluorologu3* byly změřeny emisní spektra vrstev. Z naměřených spekter byly sestaveny poměrové kalibrační křivky a ty byly porovnávány. Vrstvy byly excitovány na 460 a 407 nm, na podobných vlnových délkách (460 a 405 nm) byly excitovány i vrstvy popsané v článku pana MacCraitha zabývajícího se problematikou optických vláknových pH senzorů [13]. Emisní spektra byla měřena v rozsahu vlnových délek 480-600 nm s krokem měření 1 nm. Integrační čas byl nastaven na 0,3 s. Nastavení velikosti štěrbin, druh monochromátoru atd. *Fluorologu* zůstalo stejné jako při prvním měření emisních spekter HPTS

(viz. kapitola 3.3). Emisní spektra byla měřena pod výstupním úhlem 45° . Měření proběhlo v rozsahu pH Britton-Robinsonových pufrů 3,98-8,34 pro vrstvu rozpuštěnou v EtOH a v rozsahu 4,48-8,4 pro vrstvu rozpuštěnou v MeOH. Poměrové koeficienty byly sestaveny z poměru 460/407 nm, byly znormalizovány ke svému maximům a vyneseny do grafu 3.15. Ke kalibračním pufrům vrstvy připravené z prekursoru rozpuštěného v EtOH bylo přidáno i kontrolní médium simulující pH a prostředí panující uvnitř rostlinné buňky. Cílem měření bylo změřit pH média a porovnat naměřenou hodnotu pH s hodnotou pH změřenou skleněnou potenciometrickou elektrodou a hodnotou získanou z měření pH pomocí převodníku BCECF imobilizovaného v TEOES. Emisní spektrum média bylo měřeno při excitaci na stejných vlnových délkách, jako byla měřena i emisní spektra kalibračních pufrů (407 a 460 nm). Z poměrů maxim emise média 460/407 nm byl získán poměrový koeficient a z kalibrační křivky vrstvy byla odečtena příslušná hodnota pH (graf 3.15). Odečtená hodnota odpovídala pH 6,03.



Graf 3.15: Normalizované poměrové kalibrační křivky převodníku HPTS. Převodník byl imobilizovaný ve vrstvě PTES s přidavkem 20% glyma. Červeně je vyznačeno odečtení pH kontrolního média z kalibrační křivky vrstvy připravené z prekursoru rozpuštěného v EtOH.

V grafu 3.15 jsou vyneseny poměrové kalibrační křivky převodníku HPTS imobilizovaného ve vrstvě PTES s přidavkem 20 % glyma. Jako rozpouštědla bylo v prvním

případě použito etanolu (černá křivka), v druhém případě byl použit metanol (červená křivka). Porovnávané vrstvy se před měřením nemuseli aktivovat vysokými hodnotami pH tak jako vrstvy TEOS s imobilizovaným převodníkem BCECF. Vrstvy fungovali i v nižších hodnotách pH bezprostředně po zatvrdnutí.

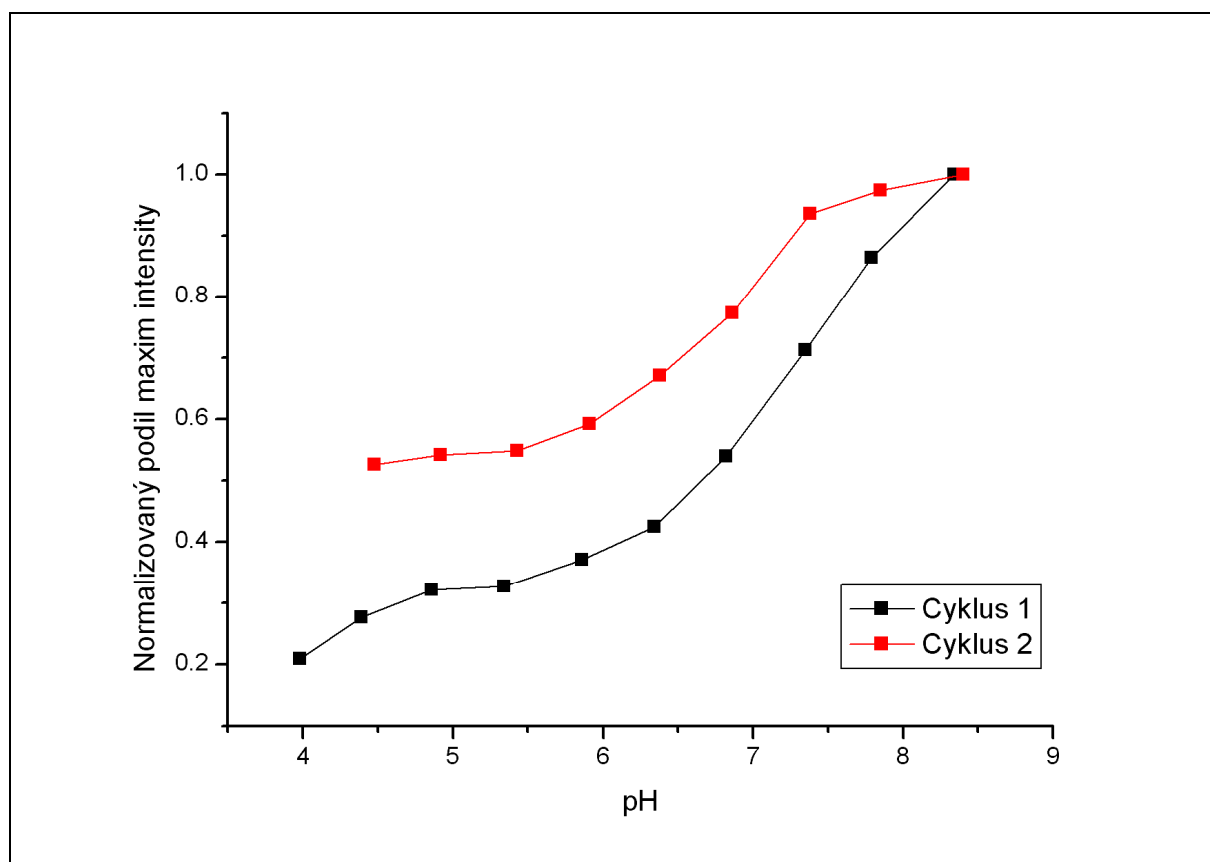
Sestavené kalibrační křivky se navzájem značně odlišovaly svým tvarem i rozsahem. Kalibrační křivka vrstvy (MeOH), v které bylo při přípravě jako rozpouštědla použito metanolu má menší rozsah i směrnici růstu. Poměrové koeficienty této křivky byly spočteny v rozsahu 0,7-1. Závislost vrstvy (MeOH) na pH je více lineární než u vrstvy (EtOH), v které bylo jako rozpouštědla použito etanolu. Kalibrační křivka vrstvy (EtOH) vykazuje v nižších hodnotách pH nižší závislost poměrových koeficientů na pH než v oblasti vyšších hodnot pH. Závislost poměrových koeficientů na pH však byla v nižších hodnotách přesto vyšší než závislost poměrových koeficientů kalibrační křivky neimobilizovaného převodníku (viz. graf 3.8). Kalibrační křivka EtOH má částečně esovitý tvar podobný kalibrační křivce publikované v článku [13] viz. graf 3.9. Klasického esovitého tvaru kalibrační křivky by bylo pravděpodobně dosaženo, kdyby při kalibraci byly použity i pufrы s ještě vyššími hodnotami pH (9-10). V této oblasti pH se předpokládá opět nižší závislost poměrových koeficientů na pH, směrnice růstu křivky by se proto snížila a křivka by mněla podobný tvar jako v nižších hodnotách pH. Esovitý tvar kalibrační křivky shodný s tvarem křivky publikované v článku [13] má křivka v grafu 3.16 sestavená po druhém cyklu měření. Spočtené poměrové koeficienty křivky (EtOH) se pohybovaly v rozsahu 0,2-1, tedy v mnohem větším rozsahu než u vrstvy MeOH. Vysoký rozptyl kalibrační křivky umožňuje přesnější (jemnější) měření pH.

Můžeme konstatovat, že imobilizací převodníku v matici se částečně podařilo kalibrační křivku převodníku HPTS posunout směrem k nižším hodnotám pH. Senzor využívající převodník HPTS by teoreticky mohl pracovat v oblasti pH 5,4-8,3. Odečtené pH kontrolního média bylo 6,03 a od pH změřeného potenciometricky se lišilo o 0,73 jednotky pH. Potenciometricky změřené pH odpovídalo hodnotě 5,3. Neshoda mezi námi naměřenou hodnotou pH a hodnotou získanou potenciometricky je vysoká a její důvody nejsou známy. Jistým překvapením však bylo, že hodnota pH změřená pomocí převodníku BCECF (imobilizován v TEOS-10% glyma) byla 6,07 a od hodnoty změřené převodníkem HPTS (imobilizován v PTES-20% glyma) se lišila jen o 0,04 jednotky pH. Naměřené hodnoty pH se téměř shodovaly, příčina neshody mezi hodnotou změřenou optickými metodami a hodnotou získanou potenciometrickým měřením je neznámá.

3.6.6 Ověření stability převodníku HPTS ve vrstvě (PTES)

Převodník HPTS byl metodou sol-gel imobilizován do xero-gelové vrstvy. Jako prekurzor vrstev byla použita směs prekurzorů připravená z 80% PTES a 20% glyma. Směs prekurzorů byla rozpuštěna v etanolu (EtOH). Připravená vrstva se sušila 24 hodin při teplotě 80 °C a poté ještě dalších 48 hodin při teplotě 140 °C. Koncentrace HPTS ve vrstvě byla 1,6 mmol/l. Nastavení *Fluorologu* zůstalo stejné jako při měření emisních spekter xero-gelových vrstev s imobilizovaným převodníkem HPTS (kapitola 3.6.5). Vrstvy byly excitovány na 460 a 407 nm, z normalizovaného poměru maxim 460/407 nm byly vypočítány poměrové koeficienty a sestaveny kalibrační křivky. Měření proběhlo ve dvou cyklech. První cyklus měření proběhl ihned po zatvrdnutí vrstvy, druhý cyklus proběhl po uplynutí tří dní od prvního měření.

Měření stability vrstvy s imobilizovaným převodníkem HPTS prokázalo podobné chování vrstvy jako měření stability vrstvy TEOES s imobilizovaným převodníkem BCECF. I v tomto případě vykazovala vrstva značnou nestabilitu. Sestavené poměrové kalibrační křivky nebyly totožné, pro stejné hodnoty pH měli odlišné poměrové koeficienty viz. graf 3.16.



Graf 3.16: Normalizované poměrové kalibrační křivky převodníku HPTS. Převodník byl imobilizovaný ve vrstvě PTES s přídatkem 20% glyma. Měření proběhlo ve dvou cyklech.

Kalibrační křivka druhého cyklu sestavená po třech dnech od prvního měření (červená křivka) měla nižší rozsah. Poměrové koeficienty se u ní pohybovaly v rozsahu 0,5-1 oproti rozsahu naměřeném bezprostředně po zatvrdnutí vrstvy 0,2-1. Tento posuv byl pravděpodobně způsoben uvolněním části převodníku v matrici a následným vyplavením z vrstvy. K uvolnění došlo pravděpodobně během prvního cyklu měření. Nižší koncentrace převodníku ve vrstvě způsobila i nižší intenzitu fluorescence a projevila se ve změně rozsahu kalibrační křivky. Kalibrační křivky prvního i druhého cyklu mají téměř stejný (esovitý) tvar. Závislost poměrových koeficientů na pH je v oblasti nižších hodnot pH menší. Z tvaru kalibrační křivky druhého cyklu měření můžeme usoudit, že po třech dnech klesla závislost poměrových koeficientů na pH v oblasti vyšších hodnot pH. Tato změna se projevila i v konečném tvaru křivky (viz graf 3.16). Výsledný tvar křivky odpovídá nižší závislosti poměrových koeficientů na pH v oblasti nižších (4-5,4) a vyšších hodnot (7,5-8,5) pH (křivka má esovitý průběh).

Zjištěná nestabilita vrstvy způsobuje stejně jako u vrstvy TEOES s převodníkem BCECF změny v intenzitě fluorescence, změny emisních spekter a tedy i změny kalibračních křivek. Toto chování znemožňuje použití jedné kalibrační křivky pro kalibraci pH senzoru.

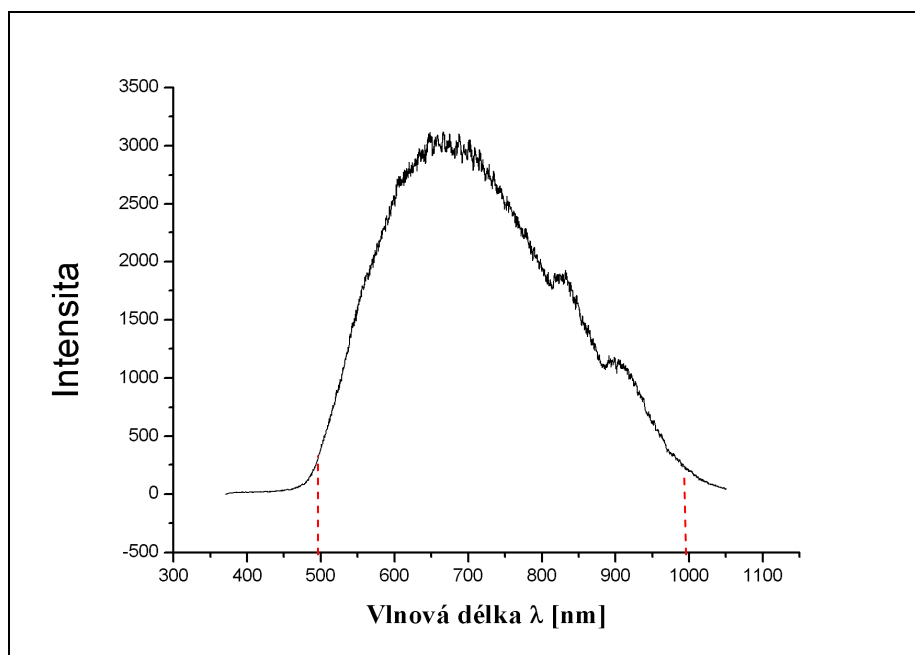
3.7 Měření s V-tapery

V-tapery byly připraveny firmou SQS z polymer-clad silica (PCS) vlákna s průměrem jádra 125 μm a průměrem obalu 200 μm . Optické vlákno (PCS) bylo vyrobeno vlastními technologiemi na Ústavu fotoniky a elektorniky (ÚFE). Všechny testované V-tapery byly připraveny na zařízení firmy SQS, které se používá k výrobě komerčních vláknových děličů. Průměr špičky V-taperu se pohyboval v rozsahu, $\Phi = 40\text{--}2\ \mu\text{m}$.

3.7.1 Přenosové vlastnosti V-taperů

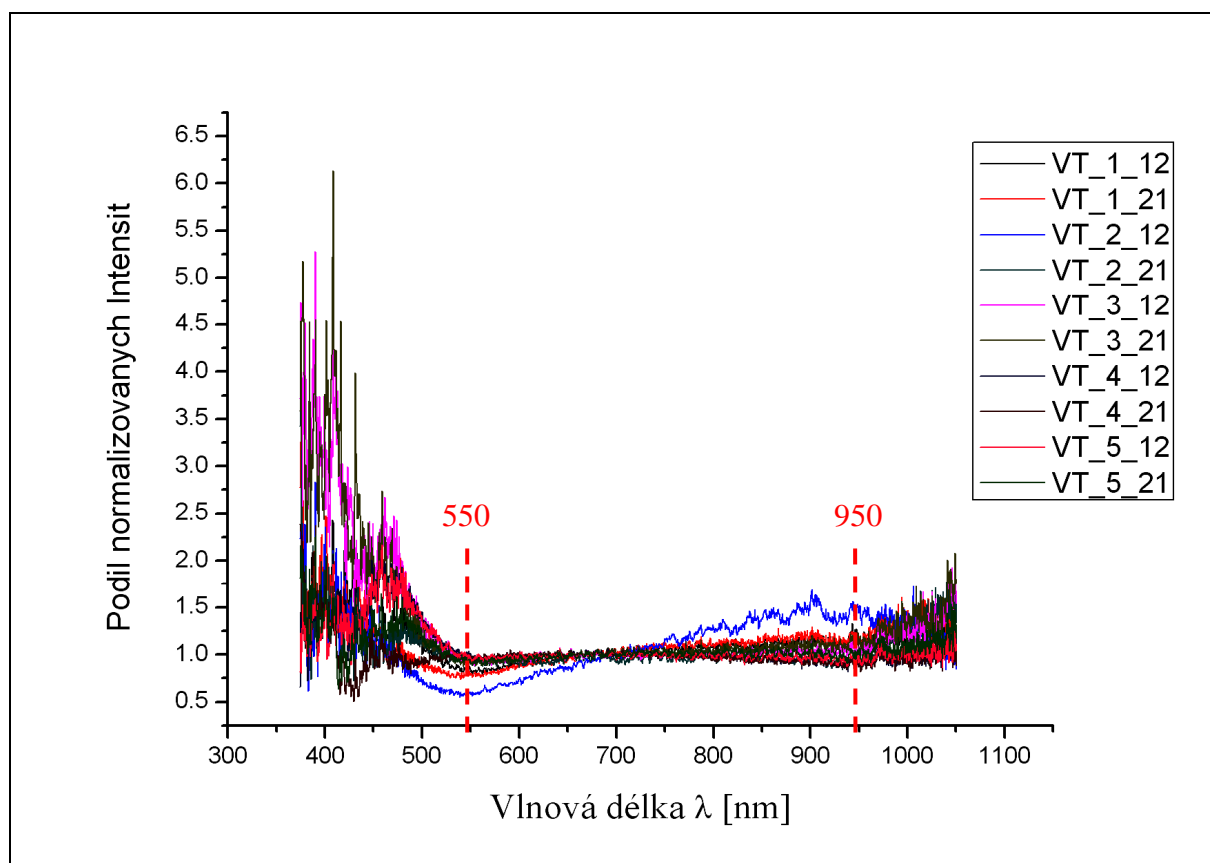
Z přenosových vlastností bylo testováno, jaký vliv bude mít V-taper na přenášené spektrum. Měření bylo realizováno pro pět V-taperů s průměrem špičky $\Phi = 9\text{--}2\ \mu\text{m}$. Přenášená spektra byla měřena v rozsahu 370–1050 nm. Do větve 1 V-taperu bylo navázáno polychromatické záření a ve větvi 2 bylo spektrofotometrem (*Ocean Optics USB2000*) měřeno výstupní spektrum. Po skončení měření se větve otočily a měření bylo zopakováno. Celkem bylo provedeno 10 měření. Naměřená spektra byla dělena spektrem referenčním (graf 3.17) a získané hodnoty byly vyneseny do grafu 3.18. Jako referenční spektrum bylo použito spektrum naměřené spektrofotometrem na 1 m dlouhém optickém PCS vláknu (z tohoto vlákna byly V-tapery vyrobeny). Spektrální omezení polychromatického zdroje bylo dáno citlivostí detektoru *Ocean Optics USB2000*. Z tvaru referenčního spektra můžeme konstatovat, že energie vyzařovaná ze zdroje není ve spektru rozprostřena rovnoměrně.

Z měření přenosová funkce V-taperu v závislosti na vlnové délce vyplynulo, že je rovna 1. V-taper tedy při přenosu spektra výrazně neomezuje žádnou vlnovou délku.



Graf 3.17: Referenční spektrum

V grafu 3.18 jsou vyneseny závislosti normalizovaného podílu intenzit přenášených spekter na vlnových délkách. Jednotlivé V-tapery jsou označeny čísly VT_1 až VT_5, jednotlivé větve pak čísly 1 a 2. Větev, do které bylo navazováno polychromatické spektrum je uvedena vždy na prvním místě za označením V-taperu. Z měření vyplynulo, že v rozsahu vlnových délek 550-950 nm nedochází k žádným významným změnám ve tvaru přenášeného spektra. Žádná vlnová délka z tohoto rozsahu není V-taperem tlumena nebo naopak upřednostňována. Jedině u V-taperu č. 2 větve 12 můžeme pozorovat jisté výkyvy v přenášeném spektru, tyto výkyvy mohly být způsobeny špatným navázáním světla do V-taperu, nebo chybou ve struktuře V-taperu způsobenou při výrobě. Fluktuace na krajích přenášeného spektra jsou způsobeny nízkou intenzitou vyzařování (graf 3.17) a nestabilitou zdroje na těchto vlnových délkách. Fluktuace nejsou tedy způsobeny přenosem spektra V-taperem, ale zdrojem samotným. V-taper tedy žádným způsobem nedeformuje přenášené spektrum, všechny vlnové délky jsou přenášeny stejně.

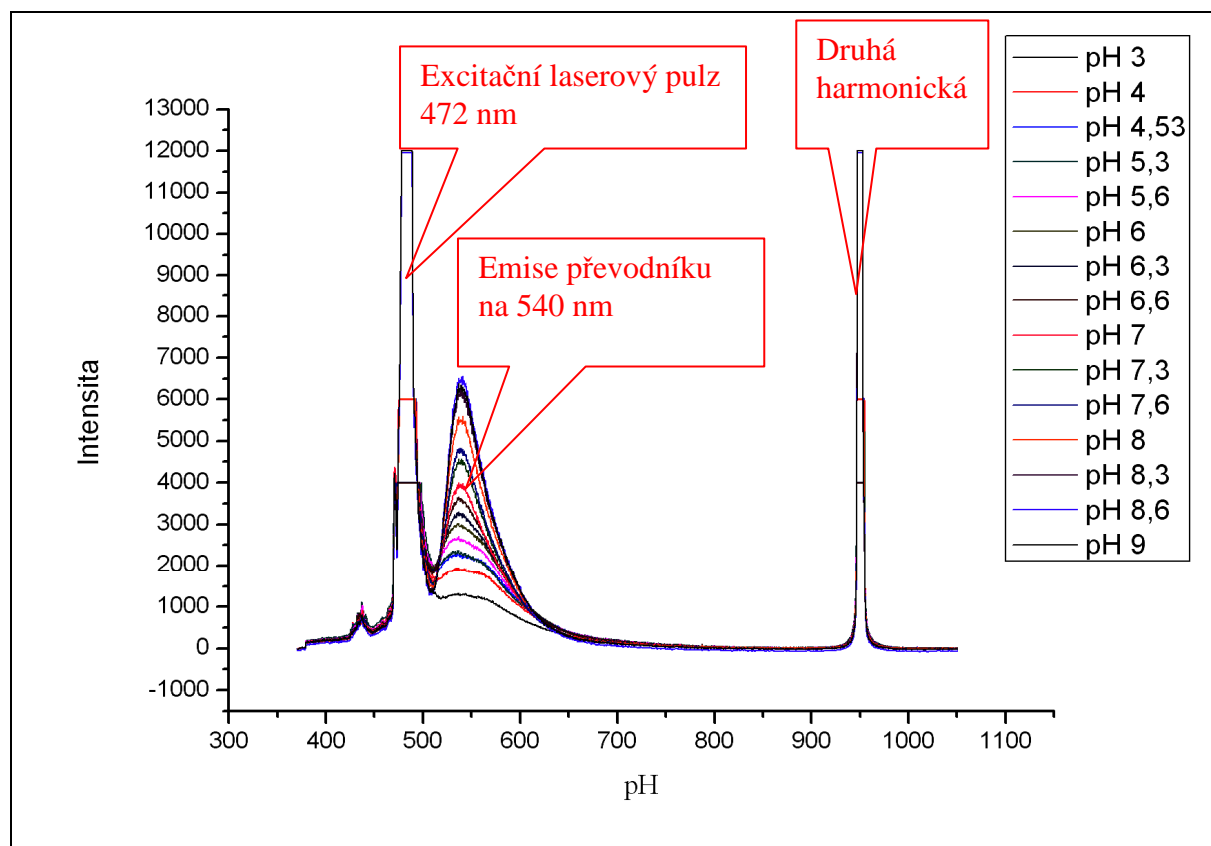


Graf 3.18: Vliv V-taperu na přenášené spektrum

3.7.2 Měření spekter převodníku BCECF V-taperem

Bylo připraveno 15 Britton-Robinsonových pufrů s rozpuštěným převodníkem BCECF. Pufry byly připraveny v rozsahu pH 3-9 s krokem cca 0,3 jednotky pH. Emisní

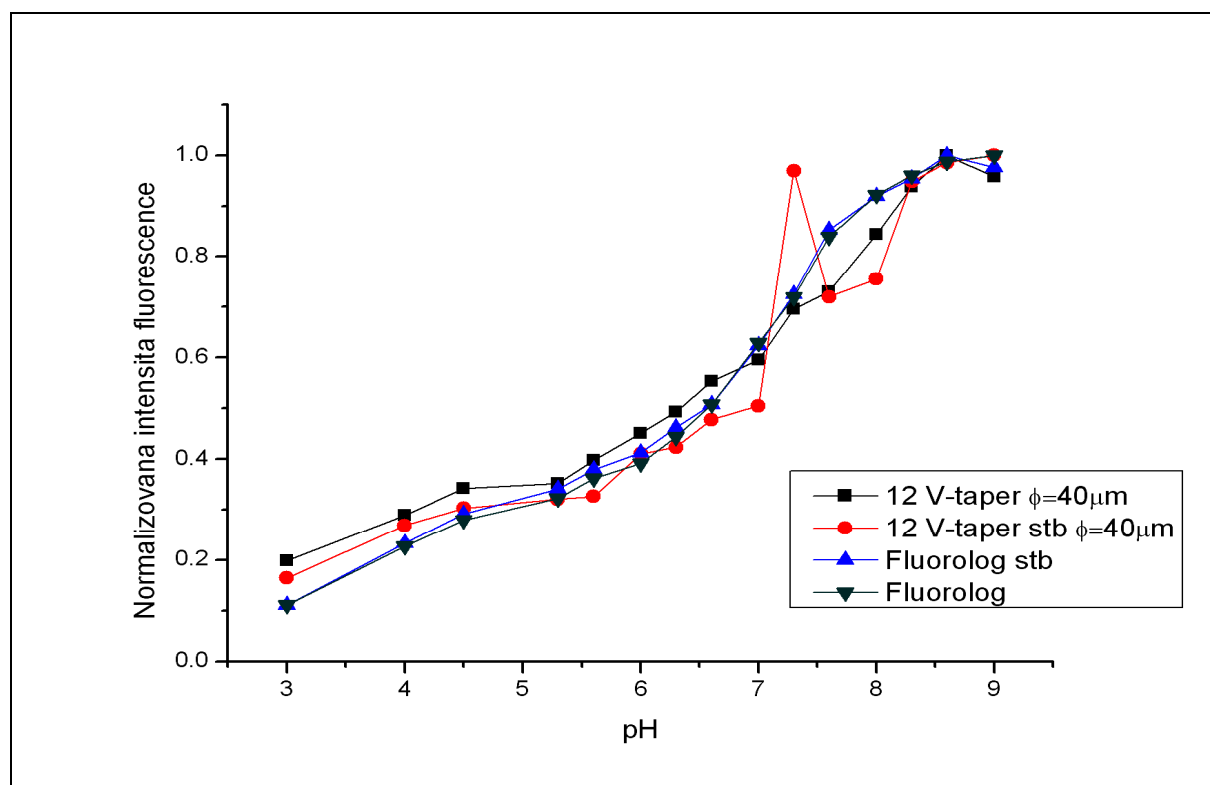
spektra byla měřena aparaturou popsanou v kapitole 3.1, schéma měření je vyobrazeno na obr. 3.16. Špička použitého V-taperu měla průměr $\Phi = 40 \mu\text{m}$. V-taper byl umístěn ve speciálním stojánku s mikroposuvem, měření spekter začalo v okamžiku, kdy se špička V-taperu ponořila do pufru s rozpuštěným převodníkem (hloubka ponoru cca 1 mm). Převodník byl excitován polovodičovým diodovým laserem na 472 nm, emisní spektra (graf 3.19) byla měřena v rozsahu 370-1050 nm vláknovým spektrofotometrem *Ocean Optics USB2000*. Maximum emise se nacházelo na 540 nm. Integrační čas měření byl nastaven na 200 ms. Výstupní výkon laseru byl nastaven na minimum. Z naměřených emisních spekter převodníků byly sestaveny závislosti maxim fluorescenční intenzity na pH. Aby mohli být křivky porovnávány, byly normalizovány ke svým maximum, $I_{\text{norm}} = I(\text{pH})/I_{\text{max}}$. Získané závislosti byly vyneseny do grafu 3.20. Na pracovišti nebyly bohužel k dispozici lasery emitující na 455 nebo 485 nm a z tohoto důvodu nemohly být sestaveny poměrové kalibrační křivky. Pro ověření stability převodníku bylo měření po 3 týdnech zopakováno a výsledky byly porovnány s měřeními realizovanými na *Fluorologu3*.



Graf 3.19: Emisní spektrum převodníku BCECF (excitace na 472 nm) měřené V-taperem.

V grafu 3.20 jsou vyneseny závislosti maxim intenzity fluorescence na pH měřené na 540 nm. *Fluorologem3* a V-taperem byly změřeny emisní spektra. Z naměřených spekter byly sestaveny kalibrační křivky. Měření bylo po třech týdnech zopakováno (křivky označené

zkratkou stb) a získané kalibrační křivky byly mezi sebou porovnávány. Kalibrační křivky měřené *Fluorologem3* sestavené v den přípravy kalibračních pufrů (zelená křivka) a kalibrační křivky sestavené z emisních spekter naměřených 3 týdny po přípravě pufrů (modrá křivka) se liší jen nepatrně. Kalibrační křivky měřené V-taperem se od kalibračních křivek měřených *Fluorologem* liší jen absolutní hodnotou maxima fluorescence. Maxima měřená V-taperem jsou v porovnání s maximy měřenými *Fluorologem* v oblasti pH (3-6) vyšší, v oblasti pH (6-9) nižší. Zaznamenané rozdíly jsou však velice malé, obě kalibrační křivky mají stejný esovitý tvar a jsou si velmi podobné. Kalibrační křivka měřená V-taperem po 3 týdnech (červená křivka) vykazuje významnou bodovou změnu intenzity pro pH 7,3. Hodnota intenzity změřená při tomto pH dosahuje hodnot měřených v oblasti pH 9. Takovýto výkyv je však v celém měření ojedinělý a byl pravděpodobně způsoben chybou v měření např. špatným kalibračním pufrům (záměna pufru, zkažení pufru). Kalibrační křivky měřené V-taperem sestavené v den přípravy kalibračních pufrů (černá křivka) a kalibrační křivky sestavené z emisních spekter naměřených 3 týdny po přípravě pufrů (červená křivka) se od sebe opět významně neliší.



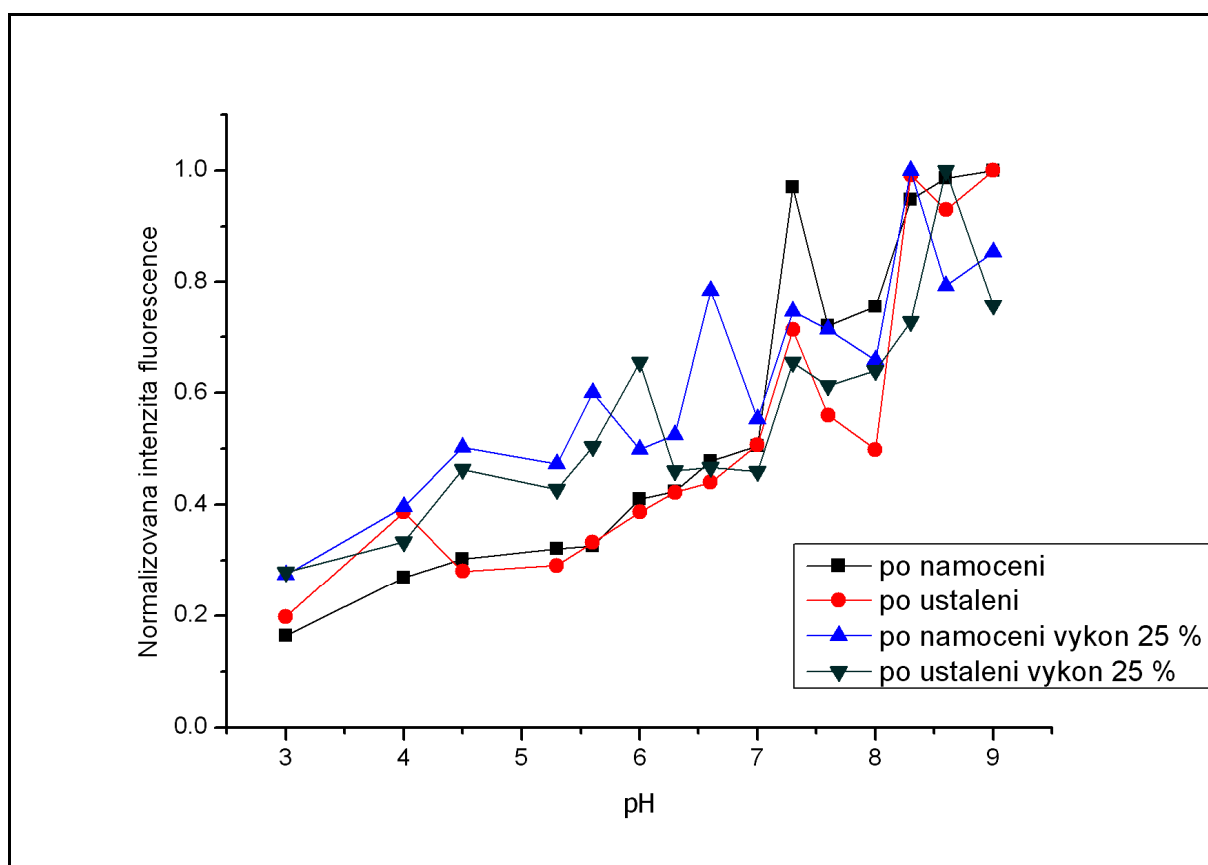
Graf: 3.20: Závislosti maxim intenzity fluorescence na pH měřené na 540 nm V-taperem a *Fluorologem3*. Zkratka *stb* označuje zopakovaná měření po 3 týdnech.

Z výsledku měření můžeme konstatovat, že při měření emisních spekter V-taperem nedochází k žádnému zkreslení naměřených spektr převodníku. Kalibrační křivky sestavené z maxim intenzity fluorescence měřené V-taperem a *Fluorologem* jsou téměř totožné. Použití

V-taperu tedy nikterak neovlivňuje výsledky měření. Opakované měření stability opět prokázalo vysokou stabilitu převodníku. Převodník vykazoval po třech týdnech jen malé změny v intenzitě fluorescence.

3.7.3 Opakované měření s V-taperem

Měření popsané v kap. 3.7.2 bylo při zachování stejného nastavení aparatury a se stejným V-taperem po 7 dnech zopakováno. Použitý V-taper byl během 7 dní používán k různému měření (minimálně 7 cyklů měření 15-ti vzorků). Do grafu 3.21 byly vyneseny závislosti maxim intenzity fluorescence na pH měřené bezprostředně po namočení V-taperu do pufru a měřené po ustálení (1 min po namočení V-taperu). Výstupní výkon laseru byl v jednom cyklu měření nastaven na minimum, ve druhém cyklu měření byl výkon zvýšen na 25% max. výkonu laseru. Při zvýšeném výstupním výkonu laseru byl integrační čas měření nastaven na 100 ms.

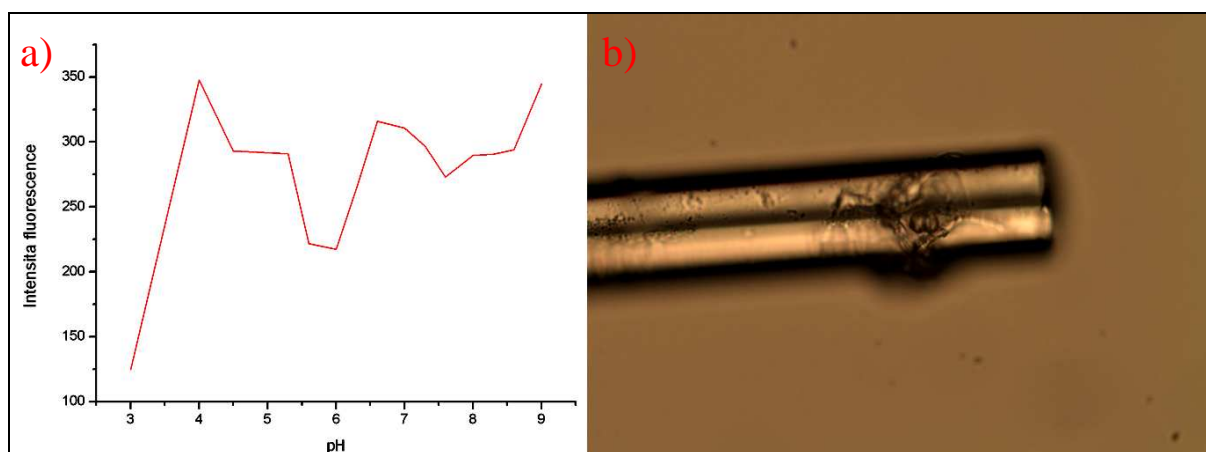


Graf 3.21: Závislost maxim intenzity fluorescence na pH měřená bezprostředně po namočení V-taperu do pufru a měřená po ustálení (1min po namočení V-taperu). Výstupní výkon nastaven na minimum a 25% max. výkonu laseru.

Z výsledku měření vyplynulo, že při zvýšení výstupního výkonu laseru dochází k větší fluktuaci měřené fluorescence (zelená a modrá křivka v grafu 2.20). Ve srovnání s grafem 3.20. můžeme konstatovat, že se změnil tvar kalibračních křivek z esovitého na neurčitý

(přímka z výraznými fluktuacemi). Závislost maxim intenzity fluorescence na pH měřená na 540 nm byla rostoucí, ale nepravidelná. U všech kalibračních křivek byly pozorovány časté a vysoké výkyvy závislosti měřené intenzity fluorescence na pH. Můžeme tedy konstatovat, že opakovaným používáním V-taperu dochází ke změnám v měřeném emisním spektru. Tyto změny jsou pravděpodobně způsobeny poškozením V-taperu nebo vytvořením tenké vrstvy ze zbytků pufrů ulpělých na čele V-taperu.

V grafu č. 3.22 a) je závislost intenzity fluorescence na pH měřené V-taperem v destilované vodě vždy po ukončení měření ve vzorku o daném pH na vlnové délce 540 nm. Nárůst intenzity z hodnoty cca 125 A.U. na v průměru 300 A.U. může být vysvětlen zbytkovou fluorescencí ulpělého vzorku na čele V-taperu. Vytvoření tenké vrstvy na čele V-taperu vede ke snížení celkové fluorescence (viditelná pouhým okem absence fluorescence ve vzorku v ose taperu) a pravděpodobně způsobuje i změny emisních spekter převodníku. Tyto změny vedou ke změně závislosti maxim intezity fluorescence na pH a tedy ke změnám kalibračních křivek. Na obr. 3.22 b) je fotografie V-taperu pořízená mikroskopem *Olympus BX-51*. Na snímku je zachycena nečistota ulpělá na V-taperu.

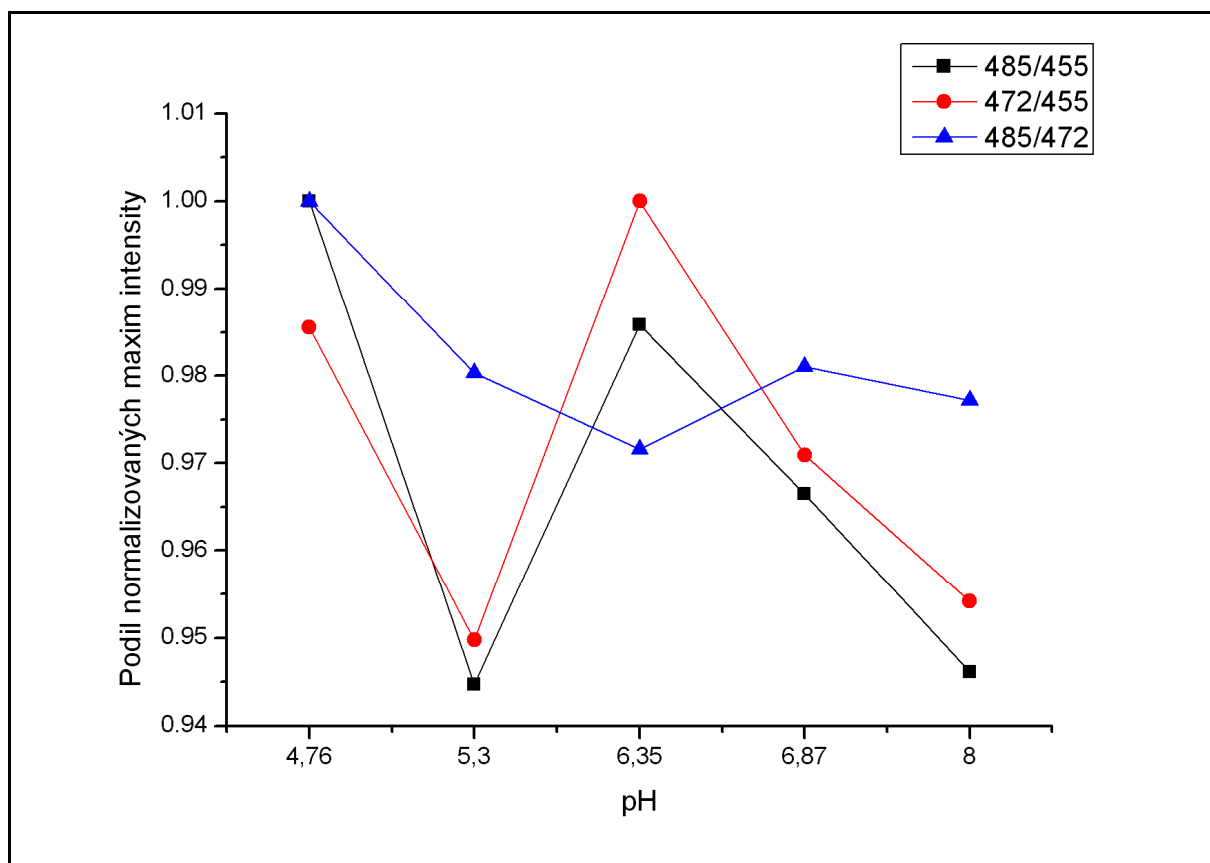


Graf 3.22 a) závislost intenzity fluorescence destilované vody na pH. b) fotografie V-taperu.

3.7.4 Měření s imobilizovaného převodníku na V-taperu

Na V-taper vyrobený firmou SQS byla nanášena fluorescenční vrstvička (ve vrstvě byl imobilizován převodník BCECF). Průměr špičky V-taperu byl $\Phi = 6 \mu\text{m}$. Vrstva byla připravená metodou popsanou v kapitole 3.6.1. Jako prekurzor vrstvy byla použita směs prekurzorů složená z 90% TEOES a 10% Glyma. Směs byla rozpuštěna v etanolu. Vrstva byla na V-taper nanášena ponořením V-taperu do roztoku a následným vytžením. Nanášená vrstva se sušila 24 hodin při teplotě 80°C a poté ještě dalších 48 hodin při teplotě 140°C .

Vrstva na konci V-taperu byla excitována pomocí xenonové výbojky a monochromátoru na 485, 472 a 455 nm. Emisní spektra byla měřena v rozsahu 370-1050 nm spektrofotometrem (*Ocean Optics USB2000*). Integrační čas byl nastaven na 200 ms. Emisní spektra byla měřena pro pH v rozsahu 4,8-8. Maxima emise převodníku ležela na 540 nm. Měření spekter bylo spouštěno v okamžiku, kdy se špička V-taperu ponořila do pufru o daném pH (hloubka ponoru cca 1 mm). Z naměřených emisních spekter byly spočteny poměrové koeficienty, podíl norm. maxim 485/455 472/455, 485/472. Do grafu 3.23 byly vyneseny závislosti poměrových koeficientů na pH.

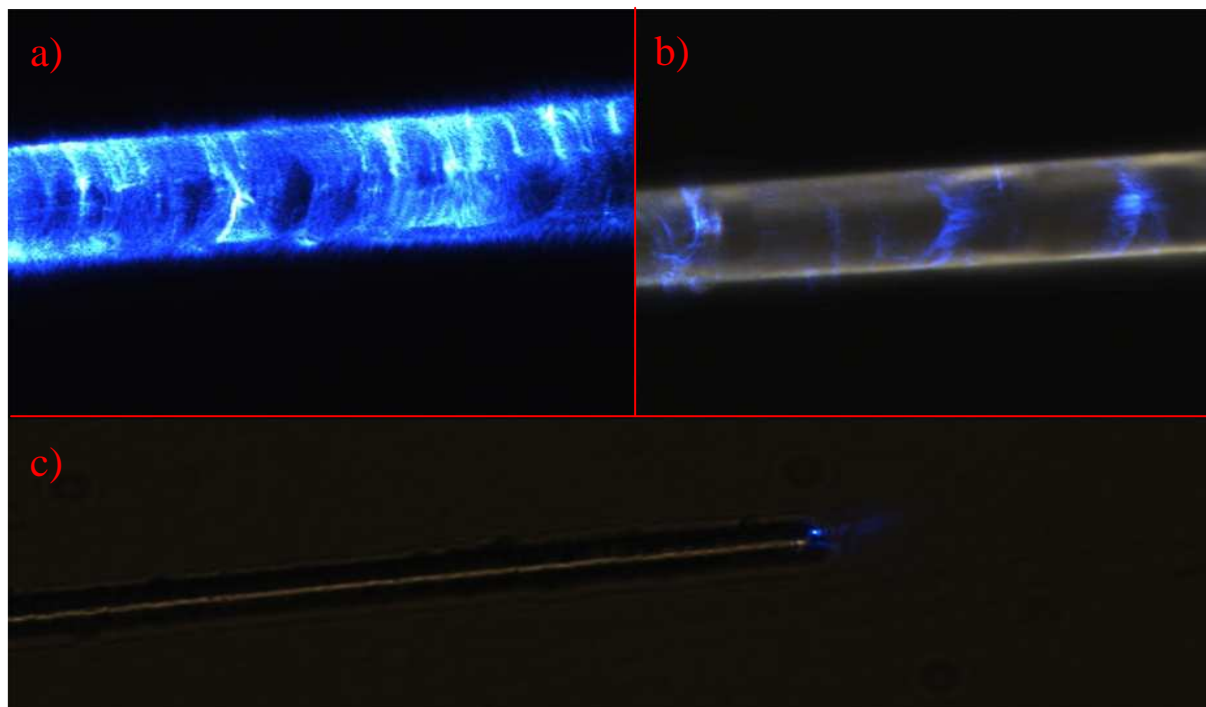


Graf 3.23: Závislost poměrových koeficientů V-taperu na pH.

V porovnání s měřením převodníku BCECF imobilizovaným na skleněném substrátu (kap 3.6.2) byla u všech měřených vzorků naměřena jen velmi slabá fluorescence v oblasti 500-570 nm. Pro pH 6,87 byla na 472 nm změřena absolutní hodnota intenzity fluorescence 1049 A. U. Naměřená hodnota fluorescence pro pH 7 na 472 nm byla při měření emisních spekter převodníku BCECF rozpuštěném v pufru 3880 A. U. Absolutní hodnota Fluorescence klesla na necelou 1/3 původní hodnoty. Z grafu 3.23 můžeme konstatovat, že se spočtené poměrové koeficienty jen velice málo liší, pohybují se jen v úzkém rozsahu hodnot (0,95-1). Poměrové koeficienty jsou tedy stejně jako emisní spektra převodníku na pH nezávislé.

Při měření kalibračních pufrů V-taperem s imobilizovaným převodníkem se nepodařilo sestavit kalibrační křivku senzoru a to z důvodu nízké, na pH nezávislé emise převodníku. Měření mohlo být ovlivněno kvalitou použitého V-taperu (nalomení, jiné poškození V-taperu) nebo kvalitou vrstvy s imobilizovaným převodníkem (popraskání, odloupení vrstvy). Imobilizace převodníku na V-taper mohla také způsobit nežádoucí změny ve vlastnostech převodníku.

Na obr. 3.18 jsou mikroskopické fotografie použitého V-taperu. Do V-taperu bylo navázáno laserové záření (472 nm). Výkon laserové diody byl měněn tak, aby byly rozpoznatelné bodové poruchy na V-taperu. Osvětlení mikroskopu bylo zeslabeno, případně zcela vypnuto tak, aby vynikly pozorované poruchy. Na V-taperu byly pozorovány rozptylová centra ve tvaru prstenců se středovou osou rovnoběžnou s osou V-taperu a rozptylující body, které byly pravděpodobně tvořeny prachovými částicemi. V případě prstenců by se mohlo jednat o praskliny na V-tapeu. Prasklinky mohly být způsobeny žíháním V-taperů s aktivní vrstvou na 140 °C, během žíhání mohlo dojít k degradaci vlákna. Poškození V-taperu během procesu sušení vrstvy mohlo vést k vyvazování excitujícího i emitujícího záření a k nízké hodnotě naměřené fluorescence. Nízká hodnota výstupní intenzity excitačního záření mohla způsobit nedostatečnou excitaci převodníku a vést k nízké na pH nezávislé emisi.



Obr. 3.18: a) unikající excitující záření z V-taperu b) jiná část V-taperu zaostřená na kruhové poruchu V-taperu c) špička V-taperu, viditelná slabá výstupní intenzita excitujícího záření.

4 Diskuze

Absorpčním spektrometrem Perkin-Elmer Lambda EZ210 byly změřeny absorpční spektra vybraných pH převodníků. Jako vhodné pH převodníky byly vybrány 2,7-bis-(2karboxyetyl)-5,6-karboxyfluorescein (BCECF), 8-Hydroxypyrene-1,3,6-Trisulfonic Acid (HPTS) a 6,8-Dihydroxy-1,3-pyrenedisulfonic acid disodium sal (HPCE). Z naměřených spekter byly určeny vhodné vlnové délky pro excitaci pH převodníků. Jako vhodné excitační vlnové délky byly vybrány ty, na kterých docházelo k největší závislosti absorpance na pH a u nichž můžeme předpokládat i podobnou závislost v emisním spektru. Excitační vlnové délky převodníku BCECF byly zvoleny na 455, 472 a 485 nm, převodníku HPTS na 370, 402 a 452 nm, převodníku HPCE na 375, 405, 450 nm.

Excitační a emisní spektra vybraných pH převodníků byla měřena modulárním fluorescenčním spektrometrem *Horiba Fluorolog 3*. Vybrané převodníky byly rozpuštěny v univerzálním Britton-Robinsonově pufru připraveném v rozsahu hodnot pH 3 až 9 s krokem cca 0,3 jednotky pH. Maximum emise převodníku BCECF se u všech excitačních délek nalézalo na 522 nm, u převodníku HPTS na 512 nm a u převodníku HPCE na 490 nm. Z naměřených emisních spekter byly spočteny poměrové koeficienty a sestaveny kalibrační křivky. Byly vybrány kalibrační křivky s nejvyšší směrnici růstu a ty byly porovnány. Poměrové kalibrační křivky převodníků HPCE a HPTS mají stejný tvar i stejnou směrnici růstu. Bohužel v námi požadované oblasti pH (5-7) mají poměrně nízkou závislost poměrových koeficientů na pH. Významná závislost se u nich projeví až v oblasti pH 7-9. Tyto převodníky by tedy byly více vhodné pro použití v této oblasti pH. V článku pana MacCraitha zabývající ho problematikou optických vláknových pH senzorů [13] je však převodník HPTS používán pro měření pH i v oblasti pH 5-7. Fluorescenční vlastnosti převodníku se pravděpodobně podařilo ovlivnit matricí, v které byl převodník imobilizován. Bylo tedy rozhodnuto, že převodník HPCE bude pro podobnost s převodníkem HPTS a vhodnost použití v oblast pH 7-9 (významná závislost poměrových koeficientů na pH) z dalších pokusů vyřazen. Převodník HPTS byl dále zkoumán jako vhodný pro použití v námi požadované oblasti pH. Převodník BCECF se jeví pro použití v námi požadovaném rozsahu pH jako nejvhodnější. Jeho směrnice růstu není sice tak strmá jako u převodníků HPCE a HPTS. Převodník však vykazuje téměř ideální (lineární) závislost poměrových koeficientů na pH v oblasti pH 4,5 až 7,3.

Stabilita převodníku BCECF rozpuštěném v univerzálním Britton-Robinsonově byla zjišťována opakovaným měřením fluorescence. Měření bylo zopakováno po uplynutí tří týdnů

od prvního měření. Převodník byl excitován na 455, 472 a 485 nm. Absolutní hodnota fluorescence po třech týdnech mírně poklesla. K maximálnímu poklesu došlo na vlnové délce 485 nm při pH 9 a to o 30548 A. U. Poměrové kalibrační křivky převodníku sestavené v den přípravy kalibračních pufrů a kalibrační křivky sestavené z emisních spekter naměřených 3 týdny po přípravě pufrů se významně nelišily (byly prakticky totožné). Převodník BCECF rozpuštěný v Britton-Robinsonově pufru vykazuje tedy vynikající stabilitu a jeví se jako vhodný pro konstrukci pH senzoru schopného opakujících se měření pH.

V práci byly porovnány tři xero-gelové vrstvy. Převodník BCECF byl metodou sol-gel imobilizován do tří xero-gelových vrstev. Jako prekurzor byl v jednotlivých vrstvách použit TEOS, APXES nebo PTES, prekurzory byly rozpuštěny v etanolu. Vrstvy byly vytvořeny bez přídavku Glyma, jednalo se tedy o vrstvy tvořené 100% TEOS, 100% APXES, 100% PTES. Všechny tři připravené vrstvy se sušily 24 hodin při teplotě 80 °C a poté ještě dalších 48 hodin při teplotě 100 °C. Koncentrace BCECF ve vrstvách byla 1,1 mmol/l. Kalibrační křivky vrstev APEX a PTES byly spočteny z poměrů maxim emise 485/455 nm a 485/472 nm. Ve vrstvě APXES mají obě kalibrační křivky podobný průběh, lišící se jen polohou maxima. Maximum křivky sestavené z poměru 485/455 nm je oproti maximu sestavenému z poměru 485/472 nm posunuto směr k vyšším hodnotám pH. Stejný posuv je zaznamenán i u kalibračních křivek vrstvy PTES. I v této vrstvě mají obě sestavené kalibrační křivky podobný průběh. Kalibrační křivky vrstvy APXES vykazují malou nepravidelnou závislost na pH (křivky vykazují fluktuace). Kalibrační křivky vrstvy PTES v závislosti na rostoucím pH nejdříve rostou, poté klesají. Takovýto průběh kalibračních křivek je však nežádoucí. Z naměřených poměrů maxim intenzit se při takovém průběhu nedá jednoznačně určit hodnota okolního pH (jednomu poměrovému koeficientu přísluší dvě rozdílné hodnoty pH). Můžeme tedy konstatovat, že obě použité matrice negativně ovlivnily závislost fluorescence převodníku na pH. Kalibrační křivky převodníku BCECF imobilizovaného ve vrstvě TEOS byly stejně jako u vrstev APXES a PTES spočteny z poměrů maxim emise 485/455 nm a 485/472 nm. Obě kalibrační křivky vykazují rostoucí v jistém rozsahu pH (4,92-7,03) lineární závislost na pH. Kalibrační křivka sestavená z poměru 485/455 nm má vyšší směrnici růstu, vykazuje strmější závislost na pH a umožní jemnější (přesnější) kalibraci pH senzoru. Matrice TEOS ovlivňuje fluorescenci pH převodníku méně než matrice APXES a PTES. Kalibrační křivky sestavené z poměrů maxim emise, zejména z poměru 485/455 nm se jeví jako velice vhodné pro kalibraci vyvíjeného pH převodníku.

Bylo provedeno ověření stability převodníku BCECF ve vrstvě TEOS. Převodník BCECF byl metodou sol-gel imobilizován do xero-gelové vrstvy. Vrstva byla excitována na

455, 472 a 485 nm. Opakovaná měření fluorescence proběhla ve čtyřech cyklech. První cyklus měření proběhl ihned po zatvrdnutí vrstvy, druhý a třetí cyklus proběhl po uplynutí jednoho dne od prvního měření. Mezi druhým a třetím cyklem uplynuly cca 4 hodiny. Čtvrtý cyklus proběhl po třech dnech od prvního měření. Z naměřených emisních spekter byly sestaveny závislosti poměrových kalibračních křivek na pH, křivky byly normalizovány ke svým maximům a byly porovnány. Z výsledku měření vyplynulo, že se vrstva před kalibrací musí aktivovat vysokými hodnotami pH (pH kolem hodnoty 9). Aktivace lze dosáhnout prostým ponořením vrstvy do pufru o pH = 9. Dále byla prokázána značná nestabilita vrstvy. Nestabilita vrstvy způsobuje změny v intenzitě fluorescence, změny emisních spekter a tedy i změny kalibračních křivek. Toto chování znemožňuje použití jedné kalibrační křivky pro kalibraci pH senzoru. Pokud by problém se stabilitou vrstvy nebyl vyřešen, musel by se senzor před každým měřením znova kalibrovat. Neustálá nutnost kalibrace senzoru by pravděpodobně značně zkomplikovala jeho využití v praxi.

Kontrola správnosti kalibrační křivky byla provedena pomocí kontrolního média. Ke kalibračním pufrům čtvrtého cyklu měření bylo přidáno i kontrolní médium simulující pH a prostředí panující uvnitř rostlinné buňky. Cílem měření bylo změřit pH média a porovnat naměřenou hodnotu pH s hodnotou pH změřenou skleněnou potenciometrickou elektrodou. Hodnoty pH média změřená optickou metodou byla 6,07 a od pH naměřeného potenciometricky se lišila o 0,77 jednotky pH. Potenciometricky změřené pH odpovídalo hodnotě 5,3. Neshoda mezi námi naměřenou hodnotou pH a hodnotou získanou potenciometricky byla vysoká, ale její důvody nebyly objasněny.

Byly porovnány vrstvy připravené z prekursoru PTES rozpuštěném v různých rozpouštědlech (etanolu a metanolu). Převodník HPTS byl metodou sol-gel imobilizován do xero-gelových vrstev. Jako prekursor vrstev byla použita směs prekursorů připravená z 80% PTES a 20% Glyma. Směs prekursorů byla rozpuštěna v etanolu (EtOH) i metanolu (MeOH). Připravené vrstvy se sušily 24 hodin při teplotě 80 °C a poté ještě dalších 48 hodin při teplotě 140 °C. Koncentrace HPTS ve vrstvách byla 1,6 mmol/l. Pomocí *Fluorologu3* byly změřeny emisní spektra vrstev. Z naměřených spekter byly sestaveny poměrové kalibrační křivky a ty byly porovnávány. Vrstvy byly excitovány na 460 a 407 nm. Porovnávané vrstvy se před měřením nemuseli aktivovat vysokými hodnotami pH tak jako vrstvy TEOS s imobilizovaným převodníkem BCECF. Vrstvy fungovaly i v nižších hodnotách pH bezprostředně po zatvrdnutí. Sestavené kalibrační křivky se navzájem značně odlišovaly svým tvarem i rozsahem. Kalibrační křivka vrstvy (MeOH), v které bylo při přípravě jako rozpouštědla použito metanolu má menší rozsah i směrnici růstu. Poměrové koeficienty této

křivky byly spočteny v rozsahu 0,7-1. Závislost vrstvy (MeOH) na pH je více lineární než u vrstvy (EtOH), v které bylo jako rozpouštědla použito etanolu. Kalibrační křivka vrstvy (EtOH) vykazuje v nižších hodnotách pH nižší závislost poměrových koeficientů na pH než v oblasti vyšších hodnot pH. Závislost poměrových koeficientů na pH však byla v nižších hodnotách přesto vyšší než závislost poměrových koeficientů kalibrační křivky neimobilizovaného převodníku. Kalibrační křivka EtOH má částečně esovitý tvar podobný kalibrační křivce publikované v článku [13]. Klasického esovitého tvaru kalibrační křivky by bylo pravděpodobně dosaženo, kdyby při kalibraci byly použity i pufrы s ještě vyššími hodnotami pH (9-10). V této oblasti pH se předpokládá opět nižší závislost poměrových koeficientů na pH, směrnice růstu křivky by se proto snížila a křivka by měla podobný tvar jako v nižších hodnotách pH. Můžeme konstatovat, že imobilizací převodníku v matrici se částečně podařilo kalibrační křivku převodníku HPTS posunout směrem k nižším hodnotám pH. Senzor využívající převodník HPTS by teoreticky mohl pracovat v oblasti pH 5,4-8,3

Kontrola správnosti kalibrační křivky převodníku HPTS byla provedena pomocí kontrolního média. Ke kalibračním pufrům měření bylo přidáno i kontrolní médium simulující pH a prostředí panující uvnitř rostlinné buňky. Cílem měření bylo změřit pH média a porovnat naměřenou hodnotu pH s hodnotou pH změřenou skleněnou potenciometrickou elektrodou. Naměřené pH kontrolního média bylo 6,03 a od pH změřeného potenciometricky se lišilo o 0,73 jednotky pH. Potenciometricky změřené pH odpovídalo hodnotě 5,3. Neshoda mezi námi naměřenou hodnotou pH a hodnotou získanou potenciometricky je vysoká a její důvody nejsou známy. Jistým překvapením však bylo, že hodnota pH změřená pomocí převodníku BCECF (imobilizován v TEOES-10% glyma) byla 6,07 a od hodnoty změřené převodníkem HPTS (imobilizován v PTES-20% glyma) se lišila jen o 0,04 jednotky pH. Naměřené hodnoty pH se téměř shodovaly, příčina neshody mezi hodnotou změřenou optickými metodami a hodnotou získanou potenciometrickým měřením je neznámá.

Měření stability vrstvy s imobilizovaným převodníkem HPTS prokázalo podobné chování vrstvy jako měření stability vrstvy TEOS s imobilizovaným převodníkem BCECF. I v tomto případě vykazovala vrstva značnou nestabilitu. Sestavené poměrové kalibrační křivky nebyly totožné, pro stejné hodnoty pH měli odlišné poměrové koeficienty. Kalibrační křivka druhého cyklu sestavená po třech dnech od prvního měření měla nižší rozsah. Poměrové koeficienty se u ní pohybovaly v rozsahu 0,5-1 oproti rozsahu naměřeném bezprostředně po zatvrdnutí vrstvy 0,2-1. Tento posuv byl pravděpodobně způsoben uvolněním části převodníku v matrici a následným vyplavením z vrstvy. K uvolnění došlo pravděpodobně během prvního cyklu měření. Nižší koncentrace převodníku ve vrstvě způsobila i nižší

intenzitu fluorescence a projevila se ve změně rozsahu kalibrační křivky. Kalibrační křivky prvního i druhého cyklu mají téměř stejný (esovitý) tvar. Závislost poměrových koeficientů na pH je v oblasti nižších hodnot pH menší. Z tvaru kalibrační křivky druhého cyklu měření můžeme usoudit, že po třech dnech klesla závislost poměrových koeficientů na pH v oblasti vyšších hodnot pH. Tato změna se projevila i v konečném tvaru křivky. Výsledný tvar křivky odpovídá nižší závislosti poměrových koeficientů na pH v oblasti nižších (4-5,4) a vyšších hodnot (7,5-8,5) pH (křivka má esovitý průběh).

Z přenosových vlastností V-taperu bylo testováno, jaký vliv bude mít V-taper na přenášené spektrum. Měření bylo realizováno pro pět V-taperů s průměrem špičky $\Phi = 9-2 \mu\text{m}$. Z měření vyplynulo, že v rozsahu vlnových délek 550-950 nm nedochází k žádným významným změnám ve tvaru přenášeného spektra. Žádná vlnová délka z tohoto rozsahu není V-taperem tlumena. Jedině u V-taperu č. 2 větve 12 můžeme pozorovat jisté výkyvy v přenášeném spektru, tyto výkyvy mohly být způsobeny špatným navázáním světla do V-taperu, nebo chybou ve struktuře V-taperu způsobenou při výrobě. Fluktuace na krajích přenášeného spektra jsou způsobeny nízkou intenzitou vyzařování a nestabilitou zdroje na těchto vlnových délkách. Fluktuace nejsou tedy způsobeny přenosem spektra V-taperem, ale zdrojem samotným. V-taper tedy žádným způsobem nedeformuje přenášené spektrum, všechny vlnové délky jsou přenášeny stejně.

Z výsledku měření emisních spekter V-taperem můžeme konstatovat, že při měření emisních spekter nedošlo k žádnému zkreslení naměřených spektr převodníku. Kalibrační křivky sestavené z maxim intenzity fluorescence měřené V-taperem a *Fluorologem* byly téměř totožné. Použití V-taperu tedy nikterak neovlivňuje výsledky měření. Opakované měření stability převodníku BCECF V-taperem opět prokázalo vysokou stabilitu převodníku. Převodník vykazoval po třech týdnech jen malé změny v intenzitě fluorescence.

Při opakovaném měření V-taperem vyplynulo, že při zvýšení výstupního výkonu laseru dochází k větší fluktuaci měřené fluorescence. Můžeme tedy konstatovat, že opakovaným používáním V-taperu dochází ke změnám v měřeném emisním spektru. Tyto změny jsou pravděpodobně způsobeny poškozením V-taperu nebo vytvořením tenké vrstvy ze zbytků pufrů ulpělých na čele V-taperu. Vytvoření tenké vrstvy na čele V-taperu vedlo pravděpodobně ke snížení celkové fluorescence (viditelná pouhým okem absence fluorescence ve vzorku v ose taperu) a pravděpodobně způsobilo i změny emisních spekter převodníku. Tyto změny vedly ke změnám závislosti maxim intezity fluorescence na pH a tedy ke změnám kalibračních křivek. Fotografie V-taperu pořízené mikroskopem *Olympus BX-51* potvrdily nečistoty zachycené na špičce V-taperu.

Při měření realizovaných s imobilizovaným převodníkem (BCECF) na V-taperu se nepodařilo sestavit kalibrační křivku senzoru a to z důvodu nízké, na pH nezávislé emise převodníku. Měření mohlo být ovlivněno kvalitou použitého V-taperu (nalomení, jiné poškození V-taperu) nebo kvalitou vrstvy s imobilizovaným převodníkem (popraskání, odloupení vrstvy). Imobilizace převodníku na V-taper mohla také způsobit nežádoucí změny ve vlastnostech převodníku. V porovnání s měřením převodníku BCECF imobilizovaným na skleněném substrátu byla u všech měřených vzorků naměřena jen velmi slabá fluorescence v oblasti 500-570 nm. Pro pH 6,87 byla na 472 nm změřena absolutní hodnota intenzity fluorescence 1049 A. U. Naměřená hodnota fluorescence pro pH 7 na 472 nm byla při měření emisních spekter převodníku BCECF rozpuštěném v pufru 3880 A. U. Absolutní hodnota Fluorescence klesla na necelou 1/3 původní hodnoty. Dále můžeme konstatovat, že se spočtené poměrové koeficienty jen velice málo liší, pohybují se jen v úzkém rozsahu hodnot (0,95-1). Poměrové koeficienty jsou tedy stejně jako emisní spektra převodníku na pH nezávislé.

Po skončení měření s V-taperem byly pořízeny jeho mikroskopické fotografie. Do V-taperu bylo navázáno laserové záření (472 nm). Výkon laserové diody byl měněn tak, aby byly rozpoznatelné bodové poruchy na V-taperu. Osvětlení mikroskopu bylo zeslabeno, případně zcela vypnuto tak, aby vynikly pozorované poruchy. Na V-taperu byly pozorovány rozptylová centra ve tvaru prstenců se středovou osou rovnoběžnou s osou V-taperu a rozptylující body, které byly pravděpodobně tvořeny prachovými částicemi. V případě prstenců by se mohlo jednat o praskliny na V-tapeu. Prasklinky mohly být způsobeny žíháním V-taperů s aktivní vrstvou na 140 °C, během žíhání mohlo dojít k degradaci vlákna. Poškození V-taperu během procesu sušení vrstvy mohlo vést k vyvazování excitujícího i emitujícího záření a k nízké hodnotě naměřené fluorescence. Nízká hodnota výstupní intenzity excitačního záření mohla způsobit nedostatečnou excitaci převodníku a vést k nízké na pH nezávislé emisi.

5 Závěr

Byla změřena absorpční spektra vybraných pH převodníků (BCECF, HPTS, HPCE) a byly vybrány vhodné vlnové délky pro excitaci převodníků. Z emisních spekter převodníků rozpuštěných v kalibračních pufrch a imobilizovaných na skleněných substrátech byly počítány poměrové koeficienty a sestavovány kalibrační křivky. Vybrané kalibrační křivky byly vzájemně porovnávány. Měření stability převodníku BCECF rozpuštěném v kalibračním pufru prokázalo jeho vysokou stabilitu. Měření stability převodníků imobilizovaných ve vrstvách prokázalo značnou nestabilitu těchto vrstev. Ověření správnosti a přesnosti sestavených kalibračních křivek prokázalo neshodu mezi pH naměřenou optickou metodou a hodnotou pH naměřenou potenciometricky. Naměřené pH kontrolního média bylo 6,07 při použití převodníku BCECF a 6,03 při použití převodníku HPTS. Od pH změřeného potenciometricky se lišilo o cca 0,73 jednotky pH. Potenciometricky změřené pH odpovídalo hodnotě 5,3. Správnost naměřené hodnoty pH optickými metodami byla tedy potvrzena dvěma nezávislými měřeními s různými pH převodníky. Důvod Odchýlení naměřených hodnot pH od hodnot naměřených potenciometricky není znám. Řešením tohoto problému by mohlo být zopakování kontrolních měření s různými hodnotami pH kontrolního média. Pokud by byl rozdíl mezi hodnotami pH naměřeným optickým senzorem a pH naměřeným potenciometricky konstantní, mohla by se kalibrační křivka optického pH senzoru touto konstantou srovnat s kalibrační křivkou potenciometrickou a naměřené hodnoty pH by se shodovaly.

Měření přenosových vlastností V-taperu prokázalo, že V-taper nemá žádný vliv na přenášené spektrum. Dále měření s V-taperem potvrdilo stabilitu převodníku rozpuštěného v kalibračním pufru. Bylo také prokázáno, že zvýšení výstupního výkonu laseru vede k větší fluktuaci měřené fluorescence. Při měření realizovaném s imobilizovaným převodníkem (BCECF) na V-taperu se nepodařilo sestavit kalibrační křivku senzoru a to z důvodu nízké, na pH nezávislé emise převodníku. Pokles intenzity měřené emise byl pravděpodobně způsobem vystavením V-taperu vysokým teplotám při fixaci pH převodníku, které vedlo k poškození V-taperu. Poškození V-taperu bylo prokázáno mikroskopickými fotografiemi pořízenými po skončení měření s V-taperem.

6 Literatura

- [1] Návrh projektu REMOROST
- [2] FIŠAR, Zdeněk: Fluorescenční spektroskopie v neurovědách, 2006 [cit. 2010-03-23]. Dostupné z WWW: <<http://www1.lf1.cuni.cz/~zfisar/fluorescence/Default.htm>>.
- [3] Joseph R. Lakowicz, *Principles of Fluorescence Spectroscopy*, 3.vyd. Vydavatelství sprinter, 2006, 921 s. ISBN 10:-0-387-31278-1
- [4] R.P. Buck (Chairman), S. Rondinini (Secretary), *The measurement of pH – Definition, Standards and Procedures*, 2001. 34 s. Report of the working party on pH
- [5] Ville Voipio, *Instrument for Measuring pH Instrument for Measuring pH with Optical Indicator Thin Film*, dissertation thesis, Finland, 2001. 192 s. Supervisor Prof. Erkki Ikonen.
- [6] EXNAR, Petr. *Metoda sol-gel*. Vyd. 1. Liberec : Technická univerzita v Liberci, 2006. 61 s. ISBN 80-7372-063-9.
- [7] Sol gel In *Wikipedia : the free encyclopedia* [online]. St. Petersburg (Florida) : Wikipedia Foundation, 28.05.2009, 19.05.2005 [cit. 2010-03-23]. Dostupné z WWW: <http://cs.wikipedia.org/wiki/Sol_gel>.
- [8] [Http://www.invitrogen.com](http://www.invitrogen.com) [online]. 2010 [cit. 2010-03-29]. Molecular Probes: The Handbook, Probes Useful at Near-Neutral pH-section 20.2, Dostupné z WWW: <<http://www.invitrogen.com/site/us/en/home/References/Molecular-Probes-The-Handbook/pH-Indicators/Probes-Useful-at-Near-Neutral-pH.html>>.
- [9] MCCULLOCH, S; UTTAMCHANDANI, D. Development of a fibre optic micro-optrode for intracellular pH measurements. *IEE Proc.- optoelectron.* June 1997, 144, s. 162-167. IEE Proceedings on-line no. 19911269.
- [10] ROLFE, Peter; SCOPESI, Fabio; SERRA, Giovanni . Advances in fibre-optic sensing in medicine and biology. *Measurement Science and Technology*. 8 May 2007, 18, s. 1683–1688. Dostupný také z WWW: <<http://iopscience.iop.org/0957-0233/18/6/S03/>>. doi: 10.1088/0957-0233/18/6/S03.
- [11] MARTAN, Tomas; POSPISILOVA, Marie; AUBRECHT, Jan. Tapered optical fibres for local pH detection
- [12] VALLEDOR, M; CAMPO, Juan Carlos. A critical comparison between two different ratiometric techniques for optical luminescence sensing : Sensors and Actuators B. *Elsevier B.V.*. 2009, 139, s. 237–244. Dostupný také z WWW: <[journal homepage: www.elsevier.com/locate/snb](http://journal.homepage:www.elsevier.com/locate/snb)>. doi:10.1016/j.snb.2009.02.024.

- [13] WENCEL, D; MACCRAITH, B.D. High performance optical ratiometric sol–gel-based pH sensor : Sensors and Actuators B. *Elsevier B.V.*. 2009, 139, s. 208–213. Dostupný také z WWW: <journal homepage: www.elsevier.com/locate/snb>. doi:10.1016/j.snb.2008.12.066.
- [14] Luminiscence. In *Wikipedia : the free encyclopedia* [online]. St. Petersburg (Florida) : Wikipedia Foundation, 18. 9. 2009, last modified on 31. 3. 2006, [cit. 2010-05-19]. Dostupné z WWW: <http://cs.wikipedia.org/wiki/Luminiscence>.